

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Vorstand: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl

Dissertation

**"Veränderung der Mikrozirkulation nach experimenteller
Subarachnoidalblutung (SAB): Kinetik, Bedeutung und
Identifikation von Mechanismen"**

Zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Diplom Biochemiker Herrn Ari Christian da Fonseca Diemel

aus

Portimão/Portugal

Jahr

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Andrej Khandoga
Prof. Dr. med. Frank Christ

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD. Dr. med. Karsten Schöller
Dr. med. Nicole Terpolilli

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 13.09.2016

Inhaltsverzeichnis

Inhalt

Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	10
1.1 Epidemiologie und Ätiologie	11
1.1.1 Aneurysmata	13
1.2 Klinische Beurteilung der SAB	15
1.2.1 Klinische Symptomatik	15
1.2.2 Skalen zur Schweregradeinteilung	15
1.2.3 Diagnose der Subarachnoidalblutung	18
1.2.4 Therapie der Subarachnoidalblutung	19
1.3 Pathophysiologie des Hirnschadens nach Subarachnoidalblutung	20
1.3.1 Frühe- und verzögerte Hirnschädigung	22
1.3.1.1 Verzögerter Vasospasmus	25
1.3.1.2 Vasospasmen in der zerebralen Mikrozirkulation	26
1.4 Stickstoffmonoxid (NO)	27
1.4.1 Stickstoffmonoxidsynthase (NOS)	29
1.5 NO im Gehirn	31
1.5.1 NO in der frühen Hirnschädigung nach SAB	32
1.5.2 NO-Donatoren	33
1.5.3 Inhaliertes NO	34
1.5.4 Rolle des NOs in der zerebralen Autoregulation	35
1.6 Rolle von Endothelin und Endothelin-Rezeptoren nach SAB	36
1.7 Ziel der Arbeit	39
2. Material & Methoden	40
2.1 Material	40
2.1.1 Geräte	40
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	42
2.1.3 Inhalationsgase	43
2.1.4 Chemikalien	43

2.1.5 Intravitalmikroskop-Ausstattung	44
2.1.6 Software	45
2.1.7 Versuchstiere.....	46
2.2 Methoden	48
2.2.1 Anästhesie und Antagonisierung.....	48
2.2.2 Mechanische Beatmung	49
2.2.3 Regelung der Körpertemperatur.....	50
2.2.4 Messung des intrakraniellen Drucks (ICP)	50
2.2.5 Messung der zerebralen Durchblutung (CBF)	50
2.2.6 Induktion einer Subarachnoidalblutung (SAB)	51
2.2.7 Jugularis-Katheter.....	52
2.2.8 Quantifizierung der Mikrozirkulation	52
2.2.8.1 Analyse des zerebralen Gefäßbaums anhand des Strahler-Schemas.....	52
2.2.8.2 Quantifizierung von Gefäßdurchmesser und Mikrovasospasmus	53
2.2.9 Intravitalmikroskopie.....	54
2.2.9.1 Venöse und arterielle Katheterisierung der Maus	54
2.2.9.2 Kraniales Fenster	55
2.2.9.3 Intravitalmikroskopie zerebraler Mikrogefäße	56
2.2.10 Inhalation	56
2.2.10.1 Stickstoffmonoxid-Inhalation (iNO)	56
2.2.10.2 Kohlendioxid-Inhalation	56
2.2.11 Anwendung von Clazosentan	56
2.2.12 Versuchsprotokolle.....	58
2.2.12.1 Stickstoffmonoxid-Inhalation (iNO)	58
2.2.12.2 Hemmung von Endothelin-1-Rezeptoren mit Clazosentan	59
2.2.12.2.1 Dosisfindung von Clazosentan	59
2.2.12.2.2 Gabe von Clazosentan nach SAB.....	60
2.2.12.3 Untersuchung der Rolle der NOS-Isoformen bei Vermittlung der CO ₂ -Reaktivität zerebraler Gefäße.....	61
3. Ergebnisse	62
3.1 Effekt von inhaliertem NO (iNO) auf die zerebrale Mikrozirkulation nach experimenteller Subarachnoidalblutung.....	62
3.1.1 Induktion der SAB.....	62

3.1.2 Einfluss des inhalierten Stickstoffmonoxids auf die zerebrale Mikrozirkulation nach SAB.....	63
3.1.2.1 Systemischer arterieller Blutdruck	63
3.1.2.2 Physiologische Parameter	64
3.1.3 Einfluss von NO auf die arteriellen Gefäßdurchmesser	64
3.1.4 Einfluss der NO-Inhalation auf die zerebralen Mikrovasospasmen.....	66
3.1.5 Räumliche Verteilung der Mikrovasospasmen.....	68
3.1.6 Effekt der NO-Inhalation auf den Grad der Mikrovasospasmen	70
3.1.7 Einfluss der NO-Inhalation auf Durchmesser zerebraler Venolen	72
3.2 Effekt der Endothelin-Rezeptor-Blockade auf die zerebrale Mikrozirkulation nach experimenteller Subarachnoidalblutung.....	72
3.2.1 Dosisfindung Clazosentan.....	72
3.2.2 Einfluss der ET1-Rezeptor-Blockade auf die zerebrale Mikrozirkulation	74
3.2.2.1 MAP	74
3.2.2.2 Blut-Gas-Analyse.....	74
3.2.2.3 Einfluss von 10 mg/kg KG/h Clazosentan auf den Durchmesser von zerebralen Arteriolen (9,5-55 µm)	75
3.2.2.4 Effekt der ET1-Rezeptorblockade auf die posthämorrhagischen Mikrovasospasmen	76
3.2.2.5 Effekt der ET1-Rezeptorblockade auf die Anzahl und den Konstriktionsgrad der Mikrovasospasmen.....	78
3.3 Rolle der NO-Synthasen bei der CO ₂ -induzierten Vasodilatation zerebraler Gefäße...	80
3.3.1 Physiologische Parameter.....	80
3.3.2 Einfluss der NOS-Isoformen auf die CO ₂ -Gefäßreaktivität	80
3.3.3 Vasodilatation unter induzierter Hyperkapnie - Wildtyp-Mäusen	82
3.3.4 Vasodilatation unter induzierter Hyperkapnie – iNOS-defiziente Mäuse	83
3.3.5 Vasodilatation unter induzierter Hyperkapnie – nNOS-defiziente Mäuse.....	84
3.3.6 Vasodilatation unter induzierter Hyperkapnie – eNOS-defiziente Mäuse.....	85
3.3.7 Vasodilatation unter induzierter Hyperkapnie der NOS-Isoformen in kleinen Arteriolen.....	86
3.3.8 Mögliche Rolle der NOS bei der Formation von Mikrovasospasmen.....	86
4. Diskussion	89
4.1 Diskussion der Methoden	89
4.1.1 Auswahl der Versuchstiere	89
4.1.2 Anästhesie	90

4.1.3 Beatmung der Versuchstiere	91
4.1.4 Messung der zerebralen Durchblutung	91
4.1.5 Wahl des SAB-Modells	92
4.1.6 Intravitalmikroskopie.....	93
4.2. Diskussion der Ergebnisse	94
4.2.1 Hämodynamische Veränderungen nach SAB.....	94
4.2.2 Effekt von iNO und den Endothelin-Rezeptor-Blocker auf den systemischen Blutdruck nach SAB	95
4.2.3 Veränderung der zerebralen Mikrozirkulation nach SAB	96
4.2.3.1 Mikrovasospasmen	96
4.2.3.2 Effekt von iNO	97
4.2.3.3 Effekt der ET-1-Rezeptorblockade	98
4.2.4 Rolle der NOS-Isoformen in der zerebralen Mikrozirkulation nach SAB	99
5. Zusammenfassung	101
6. Literaturverzeichnis	102
A. Danksagung	142
B. Lebenslauf	143

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
ATP	Adenosintriphosphat
aSAB	Aneurysmatische Subarachnoidalblutung
AU	Arbitrary Units, Perfusionseinheiten
BH₄	Tetrahydrobiopterin
BBB	Blood Brain Barrier, Blut-Hirn-Schranke
CA	Cerebral Autoregulation, Zerebrale Autoregulation
CBF	Cerebral Blood Flow, Zerebrale Durchblutung
CCT	Craniale Computertomographie
CONSCIOUS	Clazosentan to Overcome Neurological Ischemia and Infarct Occurring after Subarachnoid Hemorrhage
CT	Computertomographie
cGMP	Cyclic Guanosin Monophosphat, Zyklisches Guanosin- Monophosphat
CI	Confidence Interval, Konfidenzintervall
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CPP	Cerebral Perfusion Pressure, Zerebraler Perfusionsdruck
CSF	Cerebral Spinal Fluid, Liquor Cerebrospinalis
CTA	Computertomographische Angiographie
CVS	Cerebral Vasospasms, Zerebrale Vasospasmen
CWp	Circle Willisii Perforation
DCI	Delayed Cerebral Ischämie, Verzögerte Zerebrale Ischämie
DBI	Delayed Brain Injury, Verzögerte Hirnverletzung
DIND	Delayed Ischemic Neurological Deficit, Verzögert Auftretendes Ischämisches Neurologisches Defizit
DSA	Digitale Subtraktionsangiographie
EBI	Early Brain Injury, Frühe Hirnverletzung
EDRF	Endothelium Derived Relaxing Factor

EEG	Elektroenzephalographie
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
ET	Endothelin
ETA	Endothelin-Rezeptor-Antagonist
EtCO₂	Endexpiratorisches (end tidal-) Kohlendioxid
FITC	Fluoresceinisothiocyanate
GCS	Gasgow Coma Scale
GMP	Guanosinmonophosphat
GSNO	S-Nitrosoglutathion
GTN	Glyceryl Trinitrate (Nitroglycerin), Nitroglyzerin
GTP	Guanosintriphosphat
ICP	Intra Cranial Pressure, Intrakranieller Druck
iNO	Inhaliertes Stickstoffmonoxid
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
IVM	Intravitalmikroskopie
ISAT	International Subarachnoid Aneurysma Trial
LDF	Laser-Doppler-Fluxmetrie
LP	Lumbalpunktion
MAP	Middle Arterial Pressure, Mittlerer Arterieller Druck
MCA	Middle Cerebral Arterie, Arteria Cerebri Media
MMF	Medetomidin-Midazolam-Fentanyl
MMP	Matrix-Metalloprotease
MRT	Magnetische Resonanz Tomographie
MVS	Mikrovasospasmen
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NADPH	Reduzierte Form des Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NAPSAH	Non Aneurysmal Perimensephalic SAH, Nicht Aneurysmatische Perimensephalische SAB
7-NI	7-Nitroindazol
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	NO-Donator

NOS	Stickstoff-Monoxid-Synthase
ONOO⁻	Peroxinitrit
O₂	Sauerstoff
O₂⁻	Superoxid-Anion
p	Value of Probability, Signifikanzwert
PAASH	Prognosis on Admission of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage Scale
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PDE	Phosphodiesterase
p_{ET}CO₂	Endtidaler Kohlenstoffdioxid-Partialldruck
pH	pH-Wert
PKC	Protein-Kinase-C
ppm	part per million
ROI	Region of Interest
ROS	Reactive Oxygen Species, Reaktive-Sauerstoff-Spezies
SAB	Subarachnoidalblutung
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
sGC	Soluble Guanylat Cyclase, Lösliche Guanylatcyklase
SMTc	S-Methyl-L-Thiocitrullin
SNP	Sodium Nitroprusside, Natriumnitroprussid
TCD	Transkranielle Dopplersonographie
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor ,Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor
WFNS	World Federation Neurological Surgeons

1. Einleitung

Die World Health Organisation (WHO) definiert den Schlaganfall als ein Krankheitsbild, bei dem sich die klinischen Zeichen einer fokalen oder globalen Störung zerebraler Funktionen rasch bemerkbar machen, mindestens 24 Stunden anhalten oder zum Tode führen und offensichtlich nicht auf andere als vaskuläre Ursachen zurückgeführt werden können.¹ Demnach setzen akute fokale (oder globale) neurologische Defizite ein aufgrund einer umschriebenen (oder globalen) Durchblutungsstörung im Gehirn. Eine Durchblutungsstörung kann sowohl durch einen Durchblutungsmangel oder eine Blutung hervorgerufen werden. Globale Hirndurchblutungsstörung treten z. B. im Rahmen eines Herzstillstandes oder eines „Beinahe-Ertrinkens“ auf. Generell unterscheidet man zwischen ischämischen Schlaganfällen, spontanen intrazerebralen Hämatomen, Subarachnoidalblutungen sowie Hirnvenen- und Sinusvenenthrombosen.² Die Subarachnoidalblutung (SAB) ist ein relativ seltener Subtyp des Schlaganfalls, der dadurch gekennzeichnet ist, dass Blut in den mit Hirnflüssigkeit (Liquor cerebrospinalis) gefüllten Subarachnoidalraum gelangt. Diese Blutung wird häufig durch eine Aneurysmaruptur hervorgerufen.^{3,4} Der Subarachnoidalraum wird begrenzt durch die Spinnenhaut (Arachnoidea mater) und die innere Hirnhaut (Pia Mater), die das Hirnparenchym direkt bedeckt.

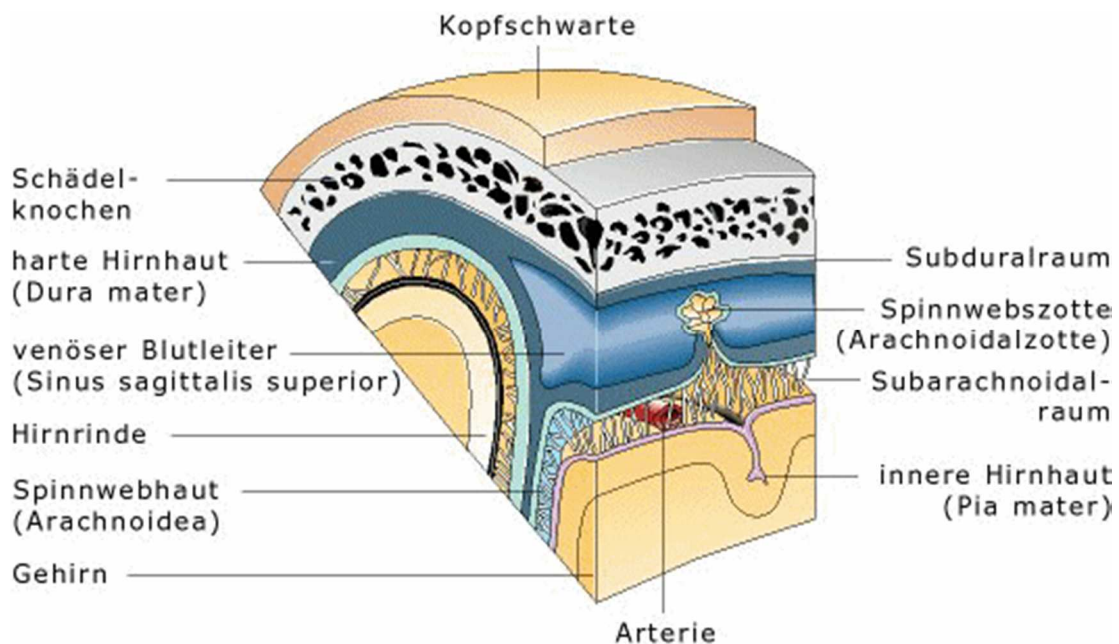


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Schädels mit den entsprechenden Regionen die nach SAB beeinträchtigt sind.

Die SAB kann spontaner oder traumatischer Natur sein.^{3,5} Die spontan auftretende SAB macht etwa 5 % aller Schlaganfälle aus und wird zu 80-85% durch die Ruptur eines intrakraniellen Aneurysmas hervorgerufen.^{3,5,6,6-8} Aufgrund deutlicher Verbesserungen der mikrochirurgischen- und radiologisch-interventionellen Therapie-Verfahren in den letzten Jahrzehnten, und der spezialisierten neurointensiv-medizinischen Behandlung der aneurysmatischen Subarachnoidalblutung (aSAB), ist die Mortalitätsrate nach SAB zwar aktuell rückläufig,⁹⁻¹¹ das Krankheitsbild hat jedoch noch immer eine hohe Morbidität und Mortalität.⁴

1.1 Epidemiologie und Ätiologie

In den Vereinigten Staaten von Amerika sind Schlaganfälle die dritthäufigsten Todesursachen. Jährlich erleiden circa 795.000 Menschen einen Schlaganfall, davon 610.000 erstmalig.¹² In circa 5% der Fälle handelt es sich um eine Subarachnoidalblutung.³ Diese weist die schlechteste Prognose aller Schlaganfälle auf, sowohl was das Überleben als auch die neurologischen Funktionsausfälle betrifft. Im europäischen Raum ist eine ähnliche Inzidenz (7 bis 10 Fälle pro 100.000 Personen) wie in Nordamerika zu finden.^{3,13-15} Die höchste Inzidenz wird jedoch für Finnland und Japan dokumentiert, 20-30 Fälle pro 100.000 Personen jährlich.¹⁶⁻¹⁹ Auch Alter und Geschlecht beeinflussen die Inzidenz der SAB. In der Altersgruppe von 25-45 Jahren weisen vor allem Männer eine erhöhte SAB-Inzidenz auf, während in der Altersgruppe von 55 bis 85 Jahren, die SAB-Inzidenz bei Frauen deutlich höher ist.^{3,15,20}

Tabelle 1: SAB-Inzidenz: Alter und Relation weiblich zu männlich (nach N.K de Rooij et al., J Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 2007).

Inzidenz der Subarachnoidalblutung nach Altersgruppe in 20 Studien			
Alter	Inzidenz pro 100.000 Person/Jahr	Inzidenzverhältnis (95% CI)	Verhältnis Frau/Mann (95% CI)
<25	2,0 (1,6 zu 2,6)	0,10 (0,08 zu 0,14)	1,36 (0,82 zu 2,27)
25-35	7,7 (6,8 zu 8,8)	0,40 (0,34 zu 0,46)	0,67 (0,51 zu 0,88)
35-45	10,5 (9,0 zu 11,3)	0,52 (0,44 zu 0,60)	0,65 (0,51 zu 0,82)
45-55	19,5 (17,8 zu 21,4)	Referenz	0,91 (0,76 zu 1,09)
55-65	24,8 (22,7 zu 27,2)	1,27 (1,12 zu 1,45)	1,15 (0,95 zu 1,38)
65-75	25,4 (23,1 zu 28,0)	1,30 (1,14 zu 1,49)	1,26 (1,04 zu 1,54)
75-85	26,2 (22,5 zu 30,4)	1,34 (1,13 zu 1,60)	1,50 (1,07 zu 2,10)
>85	31,3 (24,6 zu 39,8)	1,61 (1,24 zu 2,07)	0,84 (0,49 zu 1,44)

Die Prävalenz intrakranieller Aneurysmen wird mit ca. 2% angegeben.^{21,22} Bei bis zu ein Drittel der SAB-Patienten ist von multiplen Aneurysmen auszugehen.²³ In der Gruppe der spontan verlaufenden SAB's, die vor allem durch Ruptur von Aneurysmen charakterisiert werden, machen nicht-aneurysmatische SAB's ca. 10% aus.²⁴ Zu dieser SAB-Art gehören z.B. die perimensephalen SAB's (NAPSAH), die keine erkennbaren Blutungsquellen aufweisen und eine gute Prognose haben.^{25,26} Die Mortalität der Subarachnoidalblutung ist hoch und wird in den ersten sechs Monaten mit 50 bis 60% angegeben.¹⁵ Ein Drittel der Todesfälle ereignet sich innerhalb der ersten 30 Tage nach Blutung.²⁷ 12-15% der aSAB-Erkrankten sterben bevor eine klinische Versorgung möglich ist.^{6,28,29} Ca. 50-60% der Überlebenden haben schwere neurologische Ausfälle und benötigen lebenslang Betreuung.^{30,31} Selbst Patienten mit einem guten neurologischen Outcome (Selbstversorger) haben häufig neurokognitive und psychosoziale Einschränkungen.³²⁻³⁴ Ein Überblick über Schwere und Dramatik des Krankheitsverlaufs siehe Tabelle 2.^{6,30,31,35}

Tabelle 2: Mortalität und Morbidität der SAB im Spontanverlauf (nach Bederson et al., Stroke, 2000; Hop et al., Stroke, 1998; Huang et al., Neurosurgery, 2002 und van Gijn et al., Lancet, 2007)

Mortalität und Morbidität der SAB im Spontanverlauf	in %
Gesamtmortalität	51
Mortalität vor Erreichen der Klinik	10-15
30-Tages-Mortalität	30-60
1-Jahres-Mortalität	40
2-Jahres-Mortalität	50
Mortalität der initialen Blutung	20
Mortalität der Rezidivblutung	70
Mortalität des Vasospasmus	25
Morbidität	25
Verlust der ursprünglichen Lebensqualität	50-60

Risikofaktoren, die zu einer aneurysmatischen Subarachnoidalblutung beitragen können, sind arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie, Zigarettenkonsum (Nikotinabusus), Kokain-Missbrauch, exzessiver Alkoholkonsum und einige angeborene Bindegewebestörungen, wie z.B. das Ehlers-Danlos-Syndrom, das Marfan-Syndrom, Osteogenesis imperfecta und Pseudoxanthoma elasticum.³⁶⁻⁴⁰ Einige Patienten weisen eine familiäre Prädisposition für Aneurysmata und Subarachnoidalblutungen auf,⁴¹ dabei sind Frauen vier Mal häufiger betroffen als Männer.⁴²⁻⁴⁴ Die Familienanamnese der polyzystischen Nierenerkrankung²² und Hypertension^{36,45} scheinen u.a. das Risiko einer SAB zu erhöhen. 5-20% der SAB-Patienten weisen eine positive Familienanamnese auf.⁴⁶

1.1.1 Aneurysmata

Bei Aneurysmata handelt es sich um Aussackungen von Gefäßabschnitten, meist von Arterien; sie sind spindel- oder sackförmig und entstehen infolge angeborener oder erworbener Gefäßwandveränderungen. Aneurysmata sind wahrscheinlich das Ergebnis einer Kombination von genetischen, hämodynamischen, oder durch Nikotin- oder

Alkoholmissbrauch induzierten Strukturfehler, die zu einer Abnahme der mittleren Muskelschicht und der Tunica media, der Arterienwand, führen. Außerdem können chronische hämodynamische induzierte intravaskuläre Schubspannungen für die Bildung von aneurysmatischen Ausstülpungen in den Subarachnoidalraum verantwortlich sein.^{37,47,48} Auch die Rolle von oxidativen Stress bei der Bildung und Ruptur von Aneurysmata ist nicht zu unterschätzen.⁴⁹ Aneurysmata entwickeln sich meist in Gefäßgabelungen großer Gefäße, da turbulente Strömungen sich dort bevorzugt entwickeln. Am häufigsten sind intrakranielle Aneurysmata an der A. communicans anterior und der A. cerebri anterior lokalisiert (40%), gefolgt von der A. carotis interna (30%, hauptsächlich am intraduralen supraklinoidal gelegenen Anteil). In 20% der Fälle befinden sie sich an der A. cerebri media (MCA), d.h., dass sich die überwiegende Mehrzahl von Aneurysmata (80-90%) im vorderen Teil der basalen Hirnarterien befindet.²¹ Die restlichen 10-20% sind im hinteren Abschnitt des Circulus arteriosus Willisii, bestehend aus A. basilaris und A. vertebralis, gelegen.^{50,51} Selten werden intrazerebrale Aneurysmata durch Infektionen (sog. mykotische Aneurysmata) oder traumatische Gefäßwandschädigung verursacht. Mit dem Anstieg der Größe des Aneurysmas wird die Wandspannung erhöht, wodurch das Aneurysma zunehmend anfällig für eine Ruptur wird. Nach dem Laplace'schen Gesetz verändert sich die Wandspannung proportional zu der vierten Potenz des Aneurysmaradius, und dieser ändert sich wiederum proportional zum arteriellen Druck. Deswegen erhöht sich das Rupturrisiko durch Zunahme der Aneurysma-Größe drastisch.

$$T_h = P_t \times r_i / h \text{ (N/m}^2\text{)}$$

(T_h = über die Gefäßwanddicke integrierte Wandspannung; P_t = transmuraler Druck; r_i = Innenradius des Gefäßlumens; h = Wanddicke des Gefäßes)

Als „kritischer Durchmesser“ gelten 4-10 mm.⁵²⁻⁶³ Zufällig diagnostizierte Aneurysmata über diese Größe sollten deswegen therapiert werden.⁶³ Aneurysmata können Durchmesser von mehr als 2,5 cm erreichen (Riesen- oder Giant- Aneurysma).⁶⁴

1.2 Klinische Beurteilung der SAB

1.2.1 Klinische Symptomatik

Das Hauptsymptom der Subarachnoidalblutung ist der akute, schlagartig einsetzende und sehr starke „Vernichtungs-Kopfschmerz“^{48,65} der bei ca. 80% der SAB-Patienten beschrieben wird⁶⁶ und der maximal innerhalb von einer Minute nach Blutungsbeginn auftritt.⁶⁷ Je nach Intensität und Lokalisation der Blutung können diese Kopfschmerzen von Übelkeit, Erbrechen, Nackensteifigkeit und einer Bewusstseinsbeeinträchtigung bis zum Koma begleitet sein.⁶ Jeder zweite SAB-Patient leidet unter Hirnhautreizung (Meningismus), in bestimmten Fällen aber ist der Meningismus um einige Stunden verzögert. Die Meningen werden dann durch Blutabbauprodukte gereizt.⁴⁸ In 25% der SAB-Fälle treten subhyaloidale Glaskörperblutungen, das Terson-Syndrom, auf.^{68,69} Fokale neurologische Defizite in der Initialphase oder epileptische Anfälle sprechen für ein intrazerebrales Hämatom.⁷⁰ Bei 10–30% der Patienten tritt als initiale Symptomatik eine mildere Form des akuten Kopfschmerzes auf, die differentialdiagnostisch als Migräne, akutes Zervikalsyndrom, hypertensive Krise oder Meningitis fehlinterpretiert werden kann. Diese als „warning headache“ beschriebene Symptomatik kann bis zu drei Wochen vor dem eigentlichen Blutungsereignis auftreten. Ursache ist meist eine gedeckte Blutung aus dem später rupturierten Aneurysma.⁷¹⁻⁷⁴

1.2.2 Skalen zur Schweregradeinteilung

Vigilanz/Grad der Bewusstlosigkeit, Alter und Blutvolumen in der initialen kranialen Computertomographie (CCT) sind die Faktoren, die nach bisherigen Erkenntnissen den größten Einfluss auf das Outcome von Patienten haben.⁷⁵⁻⁷⁷ Eine Vielzahl von Skalen zur Graduierung der SAB wurden entwickelt.⁷⁷ Im Jahr 1968 erschien die Einteilung von Hunt und Hess, die eine modifizierte Form des 1956 entwickelten Systems von Botterell darstellt.⁷⁸ Ein Vorteil dieser Graduierung ist, dass sie weit verbreitet und außerdem sehr einfach anzuwenden ist.⁷⁹ Anhand der Hunt und Hess Einteilung kann das operative Risiko in Bezug auf den Zustand des Patienten zum Zeitpunkt der Operation abgeschätzt werden.⁸⁰ Der Nachteil ist, dass sie eine schwache Inter-Beobachter-Variabilität aufweist. Im Vergleich weisen Graduierungsskalen wie die WFNS (World Federation of Neurological Surgeons) und die PAASH

(Prognosis on Admission of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage) eine starke Inter-Beobachter-Variabilität auf.⁸¹ Im Jahr 1974 beschrieben Teasdale und Jennett die Glasgow Coma Scale (GCS), ein Bewertungssystem zum Einschätzen einer Bewusstseinsstörung, die ursprünglich bei traumatischen Kopfverletzungen zum Einsatz kam und erst sekundär für die Beurteilung von Patienten nach Subarachnoidalblutung verwendet wurde.⁸² Im Gegensatz zu der Einteilung nach Hunt und Hess, wird jede Rubrik einzeln graduiert. Es gibt drei verschiedene Rubriken, in die der Behandler die Patienten einstuft, um dann am Ende die Punkte zu addieren.⁸¹ Es hat sich jedoch als nachteilig erwiesen, dass die verbale Reaktion des Patienten so stark in das Ergebnis einfließt, da Patienten mit Subarachnoidalblutung oft intubiert und so in ihrer verbalen Kommunikation eingeschränkt sind.⁷⁹ Im Jahr 1988 wurde unter dem Vorsitz von Charles Drake die World Federation of Neurological Surgeons (WFNS) Scale definiert. Es ist eine Fünf-Grad-Einteilung die an der Glasgow Coma Scale angelehnt ist und beinhaltet zusätzlich das Vorhandensein eines fokalen neurologischen Defizites.^{79,83} Die Prognosis on Admission of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage (PAASH) ist eine andere Fünf-Grad-Einteilungsskala die ausschließlich in Anlehnung zur GCS entwickelt wurde.⁸⁴ WFNS und PAASH verfügen über einen guten prognostischen Wert im Hinblick auf Patienten Outcome, wirken übereinstimmend bei der Beurteilung des überlappenden CI (Konfidenzintervall) und weisen eine ähnliche Inter-Beobachter-Zuverlässigkeit auf. Trotzdem ist die PAASH-Skala leichter anwendbar und zuverlässiger bei der Beurteilung eines schlechten Outcomes bei SAB-Patienten als WFNS. Deswegen ist PAASH die geeignetste Skala für Beurteilung eines klinischen Zustandes eines SAB-Patienten.^{81,85}

Tabelle 3: Klinische Schweregradeinteilung nach HUNT und HESS, World Federation of Neurological Surgeons (WFNS) und Prognosis on Admission of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage Scale (PAASH) (nach Degen et al., Stroke, 2011).

Grade	Hunt und Hess	WFNS	PAASH
I	Asymptomatisch, leichte Kopfschmerzen, leichter Meningismus	GCS score 15	GCS score 15
II	Starke Kopfschmerzen, Meningismus, keine fokale Neurologie außer Hirnnervenstörung	GCS score 13-14, ohne fokale neurologisches Defizit	GCS score 11-14
III	Somnolenz, Verwirrtheit, leichte Fokale Neurologie	GCS score 13-14, mit fokale neurologisches Defizit	GCS score 8-10
IV	Sopor, mäßige bis schwere Hemiparese, vegetative Störung	GCS score 7-12	GCS score 4-7
V	Koma, Einklemmungszeichen	GCS score 3-5	GCS score 3

Wie in Tabelle 4 dargestellt, erlaubt die Einteilung nach Fisher (1980) eine Klassifizierung in vier Gruppen anhand der computertomografischen Morphologie der Subarachnoidalblutung.⁸⁶ Die Graduierung erfolgt nach Menge an Blut im initialen CCT. Diese Klassifizierung ist leicht anzuwenden und soll mit dem Vorkommen von verzögertem Vasospasmus korrelieren.^{87,88}

Tabelle 4: Klassifikation des Ausmaßes der Subarachnoidalblutung in der Computertomographie (nach Fisher, Neurosurgery, 1980)

Fisher-Grad	Befund im CT
1	Kein Blut im Subarachnoidalraum sichtbar
2	Diffuse Ablagerung oder dünne Schicht mit allen vertikalen Schichten des Blutes (interhemisphärische Fissur, Inselzisterne) mit weniger als einem Millimeter Dicke
3	Lokalisierte Koagel oder eine Schicht von mehr als einem Millimeter Dicke
4	Intrazerebrale oder intraventrikuläre Gerinnsel mit oder ohne SAB

1.2.3 Diagnose der Subarachnoidalblutung

Bei klinischem Verdacht auf eine SAB wird meist eine kraniale Computertomografie veranlasst, in der das subarachnoidale Blut hyperdens zur Darstellung kommt (Abbildung 2) und die Blutung bewiesen werden kann.

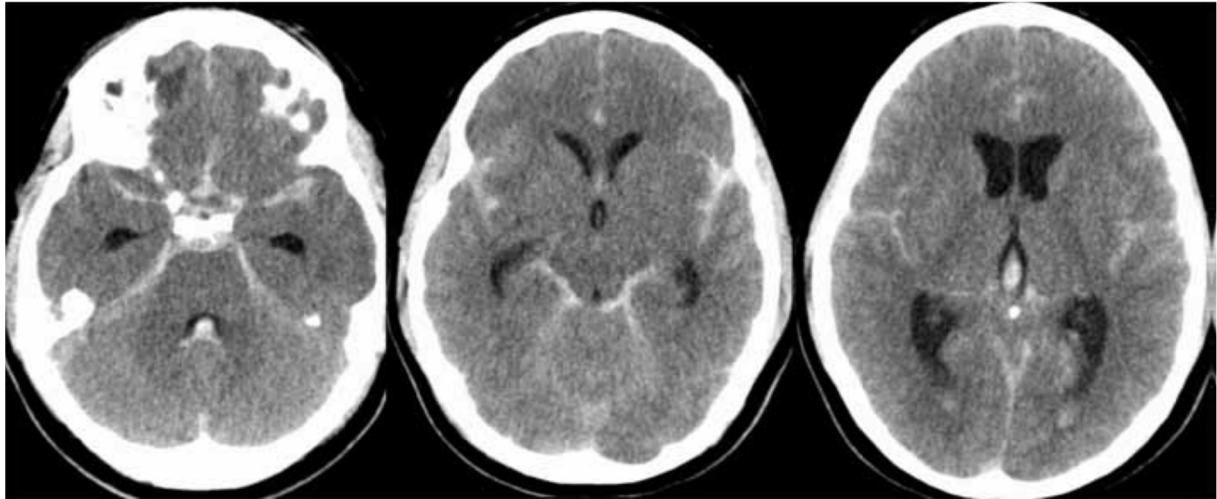


Abbildung 2: Die native CCT zeigt eine ausgedehnte basal betonte SAB Fisher°III

Darüber hinaus lassen sich in der CCT eine intraparenchymatöse Blutungskomponente oder ein Liquoraufstau erkennen. In vielen Fällen gibt bereits die Blutverteilung in der nativen CCT Hinweise auf die Lokalisation der Blutungsquelle. In der akuten Phase ist die Magnetresonanztomografie (MRT) unter Verwendung geeigneter Sequenzen zum Nachweis einer SAB genauso geeignet wie die CCT. Mit zunehmender zeitlicher Latenz zum Blutungsereignis nimmt die Dichte der Blutung in der CCT ab, dann ist die MRT der CCT zum Nachweis hämorrhagischer Residuen sogar deutlich überlegen.⁸⁹ Bei fehlendem Blutnachweis in der Bildgebung sollte etwa sechs bis zwölf Stunden nach Einsetzen des Kopfschmerzes eine Lumbalpunktion (LP) durchgeführt werden, bei der nicht der Nachweis des Blutes selbst, sondern ein xanthochromer Überstand nach Zentrifugation als sicherster Nachweis einer SAB gilt.^{6,90} Da das Timing der LP in Bezug auf den Beginn der SAB die Ergebnisse der Analyse beeinflussen kann, werden ein paar Methoden zur Unterscheidung von traumatischer und aneurysmatischer SAB vorgeschlagen wie z.B. den "drei Röhrchentest", den Öffnungsdruck, und die visuelle Inspektion der Xanthochromie.^{91,92} Wird bildgebend, oder in der Liquordiagnostik eine Subarachnoidalblutung diagnostiziert, muss die Blutungsquelle identifiziert werden; Mittel der Wahl bzw. Goldstandard

ist hierbei die digitale Subtraktionsangiografie (DSA). Sie liefert neben der Aneurysmalokalisation wichtige Informationen bezüglich der Aneurysmakonfiguration und der Lagebeziehung zu angrenzenden Gefäßen, welche die Auswahl des therapeutischen Verfahrens zur Aneurysmaausschaltung entscheidend beeinflussen. Die CT-Angiografie (CTA) ist mittlerweile in der Detektion von Blutungsquellen ähnlich sensitiv und spezifisch wie die konventionelle Angiografie und aufgrund ihrer höheren Verfügbarkeit sowie der nicht-invasiven und schnellen Anwendung sehr nützlich. Sie ist jedoch bei der Darstellung kleiner Aneurysmen (< 3 mm) der DSA unterlegen.^{93,94} Lässt sich angiografisch keine Blutungsquelle nachweisen, sollte die Untersuchung ein bis zwei Wochen nach dem Blutungsereignis wiederholt werden. Bei erneut fehlendem Nachweis einer Blutungsquelle sollte dann eine MRT von Schädel und Halswirbelsäule mit der Frage nach einem (teil-)thrombosiertem Aneurysma oder einer spinalen Blutungsursache erfolgen.

1.2.4 Therapie der Subarachnoidalblutung

SAB-Patienten sollten in spezialisierten Zentren, die sowohl in Bezug auf die intensivmedizinische Versorgung als auch auf die operative oder interventionelle Ausschaltung der Blutungsquelle große Erfahrung haben, behandelt werden bzw. verlegt werden, wenn der Allgemeinzustand es zulässt.^{15,66,95} Alle Patienten mit gesicherter SAB müssen intensivmedizinisch betreut werden.^{15,96} Das Hauptrisiko in der Frühphase der Subarachnoidalblutung ist die Nachblutung,¹⁵ die 15% der SAB-Patienten erleiden⁹⁷ und zu 70% tödlich enden.⁶⁶ Deswegen sollte in der Akutphase der systolische Blutdruck unter 140 mmHg gehalten werden. Es können hierfür antihypertensive Substanzen wie Labetalol und Nicardipin intravenös verabreicht werden.^{77,98,99} Eine Hyperglykämie, die die 10 mmol/l Grenze übersteigt, kommt bei ein Drittel der SAB-Patienten vor und ist mit einer schlechten klinischen Prognose assoziiert.¹⁰⁰⁻¹⁰³ Hyperthermie (Körpertemperatur über 38,3 °C)¹⁰⁰ ist nach aneurysmatischen SAB ebenso mit einer schlechten Prognose assoziiert,¹⁰⁴ ca. 50% der SAB-Patienten entwickeln diesen Zustand,¹⁰⁴ der medizinisch und physikalisch behandelt werden sollte.¹⁵ Pharmakologisch kann eine SAB mit der Triple-"H"-Therapie, Magnesium, Statinen, Fasudil, Erythropoietin, Nicardipine, Sildenafil, Endothelin-Rezeptor-Antagonisten, NO-Donatoren (Nitroglyzerin, Nitroprusside) und

Nimodipine behandelt werden. Von den genannten Mitteln hat allerdings nur Nimodipin einen durch klinische Studien nachgewiesenen positiven Effekt auf das Outcome nach SAB.¹⁰⁵⁻¹⁰⁹ Zur Versorgung eines rupturierten Aneurysmas stehen die mikrochirurgische Versorgung mittels Clipping und die endovaskuläre Ausschaltung mit Coils (Coiling) zur Verfügung. Die endovaskuläre Versorgung von Aneurysmata ist seit etwa 24 Jahren eine Alternative zur chirurgischen Versorgung.¹¹⁰ Coils sind Platinspiralen, die mit Hilfe eines Katheters im Aneurysma platziert werden. Dort lösen sie eine lokale Thrombose aus und trennen das Aneurysma vom Blutkreislauf. Der Zeitpunkt der Aneurysmabehandlung hat Einfluss auf den weiteren Krankheitsverlauf. So kamen mehrere klinische Studien zu dem Ergebnis, dass eine frühe chirurgische Behandlung des Aneurysmas die Reblutungsrate senkt.¹¹¹ Auch erleichtert eine frühe Behandlung des rupturierten Aneurysmas die Behandlung von Komplikationen wie zerebralen Vasospasmen.¹¹² Im International Subarachnoid Aneurysm Trial (ISAT) wurden Patienten mit rupturierten Aneurysmata, deren Aneurysmata gleichermaßen für eine neurochirurgische und endovaskuläre Versorgung geeignet waren, in zwei Gruppen randomisiert.^{113,114} Die Aneurysmata der Patienten der einen Gruppe wurden mit Clips und die Aneurysmata der Patienten der anderen Gruppe mit Coils versorgt. Für Patienten, deren Aneurysma endovaskulär mit Coils versorgt wurde, ergab sich in signifikant mehr Fällen eine bessere neurologische Erholung. Das Epilepsierisiko war in dieser Gruppe ebenfalls niedriger. In der neurochirurgisch durch Clips behandelten Patientengruppe war das Reblutungsrisiko geringer. Die Entscheidung für eine chirurgische oder endovaskuläre Behandlung des Aneurysmas hängt aber von mehreren Faktoren ab: Patientenalter, Aneurysmalokalisation und -morphologie, und Allgemeinzustand des Patienten spielen ebenfalls eine Rolle.¹¹⁵

1.3 Pathophysiologie des Hirnschadens nach Subarachnoidalblutung

Im Rahmen der Subarachnoidalblutung tritt Blut in den Subarachnoidalraum aus. Die Menge ist abhängig von der Blutungsquelle und dem arteriellen Blutdruck. Das zusätzliche Volumen führt im geschlossenen System des Neurokraniums zu einer plötzlichen Erhöhung des intrakraniellen Drucks.¹¹⁶ Die Folgen einer solchen Druckerhöhung werden von der Monroe-Kellie-Doktrin vorhergesagt, die feststellt, dass die

Summe der drei Komponenten in der Schädelkalotte, Gehirnparenchym, (arterielles und venöses) Blut und Liquor cerebrospinalis stets gleich bleiben muss, um den intrakraniellen Druck konstant zu halten (Abbildung 3). Kommt es zur Volumenzunahme im Subarachnoidalraum (wie z. B. bei einer SAB) können zunächst Blut und Liquor verdrängt werden. Bis zu einem gewissen Grad kann so der intrakranielle Druck im Normalbereich gehalten werden. Sind jedoch die Reservekapazitäten aufgebraucht, führt jede weitere Volumenzunahme zu einem linearen Anstieg des ICP.

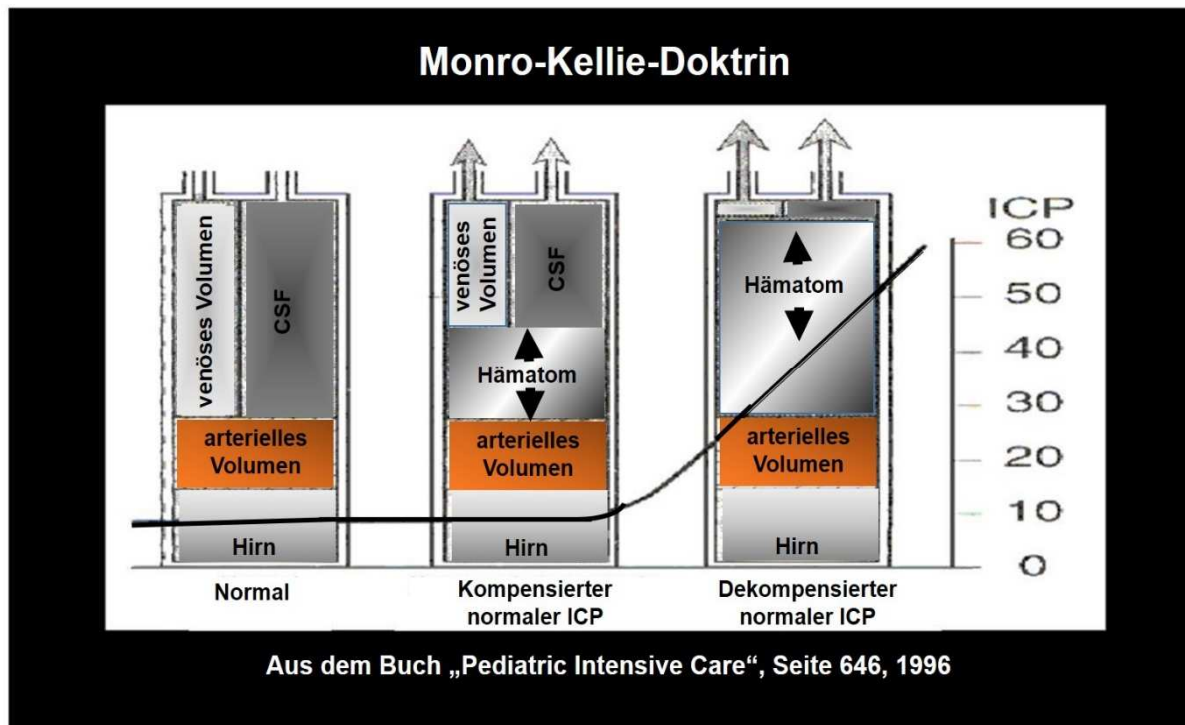


Abbildung 3: Monro-Kellie-Doktrin

Die schlagartige Drucksteigerung durch das zusätzliche Blutvolumen bei der SAB lässt den intrakraniellen Druck (Normalwert von 5-15 mmHg) auf deutlich erhöhte Werte (28 mmHg bei kleinen Hämatomen, bis 80 mmHg bei großen Hämatomen) ansteigen.¹¹⁷⁻¹²⁰ Dies, sowie der Kontakt von Blut bzw. Blutbestandteilen mit der schmerzempfindlichen Dura mater, sind die Ursachen des pathognomonischen, schlagartig auftretenden starken Kopfschmerzes.^{8,65} Übersteigt der intrakranielle Druck (auch nur kurzfristig) den systemischen Blutdruck, kann kein Blut nach intrakraniell gelangen, was zur Minderdurchblutung bzw. zum Durchblutungsstillstand (globale Ischämie) des Gehirnes führt. Aufgrund der kurzen Ischämietoleranz des Gehirns^{118,121} kann in der Folge rasch ein Bewusstseinsverlust eintreten. Bleibt der ICP dauerhaft erhöht, ist der Bewusstseinsverlust dauerhaft und führt in schneller Folge

zum irreversiblen Hirnschaden und zum Tod. Sinkt die intrakranielle Hypertension nach einer initialen Druckspitze wieder ab und wird die zerebrale Durchblutung wieder ermöglicht, kann das Bewusstsein schnell wiedererlangt werden. Eine weitere Folge der initialen Blutung ist der Hydrozephalus. Entweder kann es durch Verschluss der Liquorabflußwege durch Hämatome (v. a. im Bereich des Aquaeductus cerebri) zum Hydrozephalus occlusivus kommen oder durch Hemmung der Resorption im Bereich der Pacchionini Granulation^{50,122} zum Hydrozephalus aresorptivus. Eine weitere Komplikation der SAB ist das Auftreten eines Hirnödems. Das Hirnödem wird traditionell in zwei große Subtypen eingeteilt, in das zytotoxische und vasogene Hirnödem. Von diesen weist vor allem das zytotoxische Hirnödem besondere Resistenz gegenüber jegliche medizinische Behandlung auf.¹²³ Durch immer weiter steigendem Hirndruck wird die Perfusion des Gehirns weiter eingeschränkt, und es kommt zur globalen Ischämie mit begleitenden disseminierten kortikalen und hypothalamischen Läsionen.¹²⁴⁻¹²⁶ Die Blutung führt sowohl beim Menschen als auch im experimentellen Modell zu einer sofortigen und andauernden Reduktion der zerebralen Durchblutung.¹²⁷⁻¹³¹ Es wird vermutet, dass die Menge und Lokalisation des Blutes nach Subarachnoidalblutung verantwortlich für die Entstehung von zerebralen Vasospasmen ist, und mit der Lokalisation und Ausprägung der Spasmen korreliert.⁵⁰

1.3.1 Frühe- und verzögerte Hirnschädigung

Der Begriff "Frühe Hirnschädigung" (Early Brain Injury, EBI) wird seit ca. 2004 verwendet. Er fasst die akuten pathophysiologischen Vorgänge, die innerhalb der ersten 72 Stunden nach SAB-Blutung auftreten, zusammen.^{129,130} Eine schematische Übersicht bietet Abbildung 4a. Zu den Ereignissen, die durch die Subarachnoidalblutung hervorgerufen werden, gehören die Beeinträchtigung der zerebralen Autoregulation,¹³² die Störung der Blut-Hirn-Schranke,¹³² die Aktivierung von Entzündungswegen und Apoptose,¹³² Exzitotoxizität und oxidativer Stress.¹³² Diese Vorgänge werden zu gewissen Zeitpunkten durch Blut und Blutbestandteile und durch transiente zerebrale Ischämie hervorgerufen.¹³³⁻¹³⁶ Bereits Sekunden nach der SAB sind Veränderungen der zerebralen Physiologie (ICP-Anstieg, CPP- Verringerung, CBF-Verringerung, Blutdruck-Anstieg), der Ionen-Homöostase und der elektrischen Hirnaktivität (EEG-Amplitude) nachzuweisen.¹³² Ab der ersten Stunde nach SAB

treten folgende Ereignisse auf: Konstriktionen von kleinen und großen Gefäßen,¹³⁷ Abbau von Kollagen-IV (größtes Protein der Basal Lamina),¹³⁸ die Gefäßpermeabilität erhöht sich während die Gefäßperfusion geringer wird,¹³⁹ Zelltodsignalwege werden aktiviert,¹³² Erhöhung der Glutamat-Konzentration in der zerebralen interstitiellen Flüssigkeit,¹⁴⁰ Anstieg des Hirnwassergehalt,¹⁴¹ der ICP stabilisiert sich auf einem neuen Plateau, das über dem basalen Wert liegt,^{127,130} der CPP erholt sich,¹²⁷ die zerebrale Durchblutung und Autoregulation bleiben beeinträchtigt,¹⁴² und es entstehen Veränderungen auf molekularer Ebene (starke Verringerung der NO-Konzentration,¹⁴³ Thrombozyten-Aktivierung und intraluminale Aggregation,¹⁴⁴ Anstieg der ET-1-Konzentration,¹⁴⁵ Anstieg des oxidativen Stresses,^{146,147} Erhöhung der Zytokin-Expression).¹³² Der Begriff verzögerte Hirnverletzung (Delayed Brain Injury, DBI) beschreibt pathophysiologische Mechanismen, die sich in der späteren Phase nach SAB (3-21 Tage) ereignen und zu einer sekundären Schädigung des Hirngewebes führen. Diese Vorgänge sind direkte Folge des EBI und können zu einer verzögert auftretenden zerebralen Ischämie (Delayed Cerebral Ischemia, DCI) führen.¹⁴⁸ DCI wird in bis zu 30% der Fälle für schlechtes Outcome oder Tod von Patienten, deren Aneurysma erfolgreich behandelt werden konnte, verantwortlich gemacht.¹⁴⁹ Die Ursachen sind noch nicht völlig geklärt, aber man vermutet, dass DCI u. a. durch verzögert auftretende Vasospasmen, Thrombose, Dysfunktion der Mikrozirkulation und Cortical Spreading Ischemia verursacht wird (Abbildung 4b). Diese Prozesse werden wahrscheinlich durch Mechanismen der frühen Hirnschädigung ausgelöst bzw. mitverursacht.¹³³

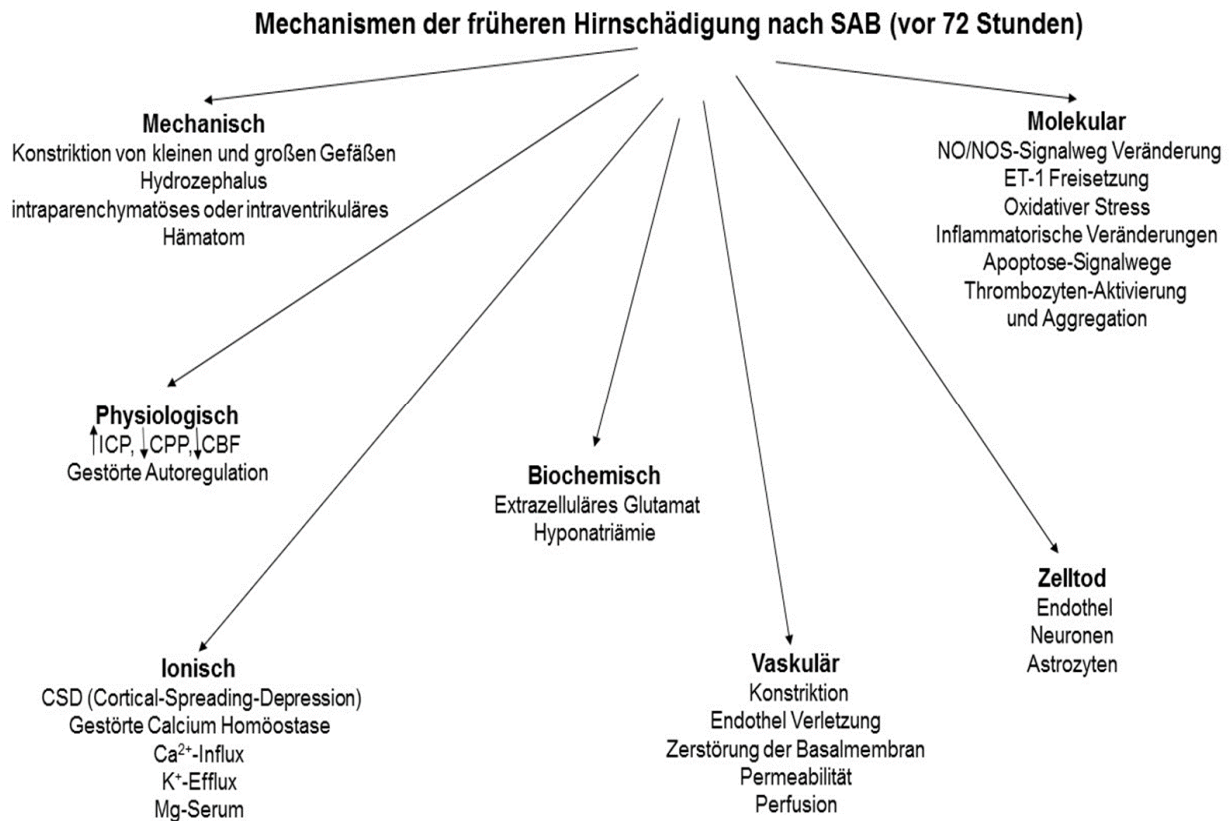


Abbildung 4a: Mechanismen der frühen Hirnschädigung (EBI) nach SAB (Modifiziert nach Sehba, F., et al., Mol Neurobiol, 2011).

Mechanismen der verzögerten Hirnschädigung nach SAB (nach 72 Stunden)

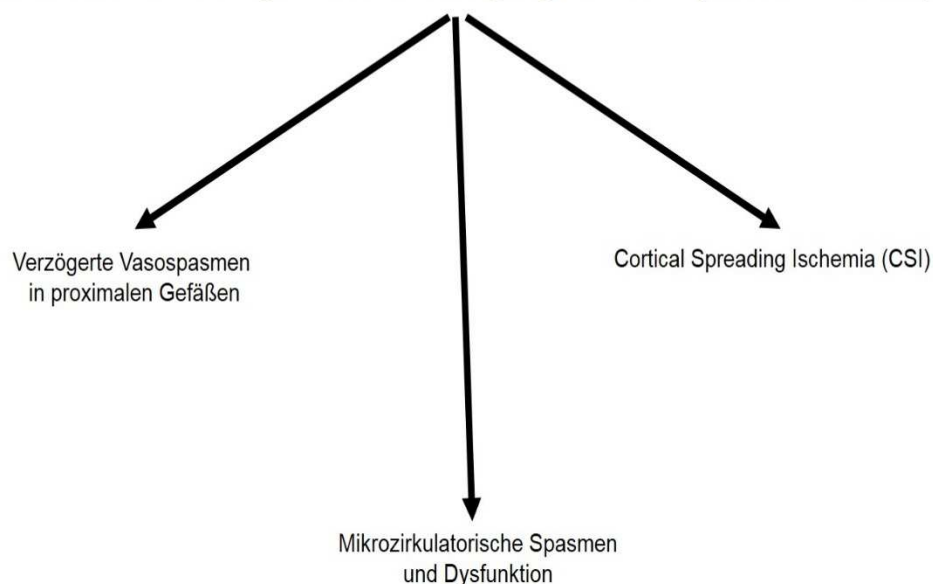


Abbildung 4b: Mechanismen der verzögerten Hirnschädigung (DBI) nach SAB (Cossu, G., et al., BioMed Research Int., 2014).

1.3.1.1 Verzögerter Vasospasmus

Zerebrale Vasospasmen, die erstmalig durch Robertson (1949), Ecker und Rienschneider (1951) nach einer Subarachnoidalblutung beschrieben wurden,^{150,151} sind Verengungen von zerebrale Arterien,^{122,152,153} die auch durch andere intrakraniellen Blutungen hervorgerufen werden können.^{154,155,156,157} Verzögerte zerebrale Vasospasmen treten frühestens drei Tage nach SAB auf. Sie erreichen den Höhepunkt ihrer Inzidenz zwischen dem 6. und 11. Tag und können bis zu 3 Wochen nach der Blutung vorherrschen.¹⁵⁸ Im klinischen Alltag wird der Vasospasmus meist nicht per Angiographie, sondern mit Hilfe der transkraniellen Dopplersonographie (TCD) diagnostiziert.¹⁵⁹ Mit diesem nicht invasiven Verfahren kann die Blutfließgeschwindigkeit in den größeren Hirngefäßen bestimmt werden.¹⁵⁹ Die zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen sind bisher nicht völlig geklärt. Ein wichtiger Faktor für die Entstehung eines verzögerten Vasospasmus scheint der Abbau von Erythrozyten im Subarachnoidalraum zu sein. Dadurch werden Kalium- und vor allen Eisen-Ionen freigesetzt, die zu einer erhöhten Expression von leistungsstarken Vasokonstriktoren wie Thromboxan, Endothelin-1, Serotonin, Plättchen-Aktivierender-Faktoren, und 20-Hydroxyeicosatetraenoid-Säure, die in der Zerebrospinalflüssigkeit (CSF) führen können.^{160,161} Der intrazelluläre Calcium-Anstieg in den glatten Muskelzellen, und die ionische Veränderung, wie z.B. der Anstieg des Kalium- und Verringerung des Magnesium-Spiegels im Serum, sind weitere Faktoren die die Vasospasmenbildung fördern.¹³³ Ein großer Teil der Forschung wurde von der Annahme beeinflusst, dass CVS für die verzögerte zerebrale Ischämie (DCI) verantwortlich ist. Heute ist es allgemein anerkannt, dass nicht alle Patienten mit CVS DCI entwickeln. Umgekehrt kann DCI oder DIND in Abwesenheit von CVS auftreten.^{133,135,162-166} Daher ist anzunehmen, dass CVS nicht die einzige Ursache für die Entstehung von DCI darstellt.^{167,168} Mechanismen die für die Pathogenese des DCI und für dessen schlechte Prognose nach SAB beitragen, sind die frühe Hirnverletzung,¹³² Cortical Spreading Depression,^{168,169} Entzündungen,¹⁷⁰⁻¹⁷³ Mikrothromben^{132,174} sowie CVS.¹⁷⁵ Obwohl bei ca. 70% der SAB-Patienten angiographisch zerebrale Vasospasmen nachgewiesen werden können, entwickeln nur 30% ein verzögertes neurologisches Defizit (DIND).¹⁷⁶ Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Outcome nach SAB durch eine pharmakologische Hemmung der Vasospasmusentstehung nicht verbessert werden kann.^{177,178} Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Spasmen der

großen Hirngefäße nicht die einzige Ursache für die hohe Mortalität und Morbiditätsrate der SAB beim Menschen sind.¹³³ Dies legt die Vermutung nahe, dass die zerebrale Mikrozirkulation eine entscheidende Rolle für die nach SAB beobachteten Durchblutungsstörungen spielen könnte.^{179,180}

1.3.1.2 Vasospasmen in der zerebralen Mikrozirkulation

Herz und Mitarbeiter konnten bereits 1975 zeigen, dass die Applikation von Blut auf piaie Mikrogefäße zu einer sofortigen Vasokonstriktion führt.¹⁸¹ Dass dieser Effekt auch bei SAB-Patienten auftritt, wurde 2003 mittels *orthogonal polarization spectral imaging* nachgewiesen: SAB-Patienten, die innerhalb von drei Tagen operiert wurden, zeigten eine deutlich verringerte Kapillar-Dichte, außerdem wiesen kleine Arterien und Arteriolen der Kortex-Oberfläche perlenschnurartige Einengungen, also Vasospasmen, auf.¹⁸² Uhl et al. postulierten in ihrer Studie, dass diese Vasospasmen der zerebralen Mikrozirkulation möglicherweise zur klinischen Symptomatik beitragen, und diese den postoperativen Verlauf beeinflussen können.¹⁸² Pennings et al. zeigten 2004 bei SAB-Patienten mit ähnlicher Methodik nach Hyperventilation eine verstärkte kontraktile Reaktion pialer Mikroarteriolen, sowie die Ausbildung von Spasmen dieser Gefäße mit perlenschnurartigem Muster.¹⁸³ Diese Veränderungen zeigten sich lediglich bei Patienten, die früh nach SAB operiert wurden. Patienten die nach 48 Std. operiert wurden, wiesen dieses Muster nicht auf.¹⁸³ Um das Phänomen der früh auftretenden Spasmen der zerebralen Mikrozirkulation genauer zu untersuchen, wurde in unserer Arbeitsgruppe ein experimentelles Modell der SAB entwickelt, mit dem die zerebrale Mikrozirkulation in vivo mittels Epifluoreszenz-Mikroskopie zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach SAB untersucht werden konnte. Mit diesem Modell konnten gezeigt werden, dass drei und sechs Stunden nach SAB ca. 70% der Gefäße, die von der MCA stammten, mikroarterioläre Kontraktionen aufwiesen, während nach 72 Stunden die Konstriktionshäufigkeit auf 56% gesunken war.¹⁸⁴ Dieses Phänomen wurde Mikrovasospasmus genannt und könnte für die frühe Störung der Mikrozirkulation nach SAB mitverantwortlich sein. Die Ursachen bzw. Mechanismen, die zum Mikrovasospasmus führen, sind noch unbekannt.^{167,180}

1.4 Stickstoffmonoxid (NO)

Stickstoffmonoxid ist ein bioaktives Molekül, das mit anderen Molekülen sowohl Redoxreaktionen als auch additive Reaktionen eingehen kann.^{185,186} Aufgrund seiner geringen Größe kann es in kurzer Zeit biologische Membranen durchqueren und lokal verschiedene Funktionen ausüben.^{187,188} Ende der 1970er Jahre bewiesen Furchgott und Zawadzki et al., dass der sogenannte Endothelium derived relaxing factor (EDRF) Stickstoffmonoxid ist.¹⁸⁹⁻¹⁹¹ Ein Gas mit kurzer Halbwertszeit ($t_{1/2} = 3-5$ Sekunden),¹⁸⁹ dass an der Regulation einer Vielzahl von biologischen und physiologischen Vorgängen wie Modulation der Neurotransmission (z.B. Freisetzung von Dopamin im Striatum¹⁹²), am Immunsystem (z.B. MMP sezerniert durch Makrophagen¹⁹³) und an Lern- und Gedächtnis-Prozessen beteiligt ist.^{194-196,197} NO wird von der Isoenzymgruppe der NO-Synthasen (NOS) aus der semiessentiellen Aminosäure L-Arginin synthetisiert.^{197,198} Im Hirngewebe gibt es alle drei Isoformen, die endotheliale (eNOS),¹⁹⁹⁻²⁰¹ neuronale- (nNOS)²⁰²⁻²⁰⁴ und induzierbare NO-Synthase (iNOS).^{201,205,206} Die NO-Synthasen katalysieren unter Mitwirkung von Tetrahydrobiopterin (BH₄), O₂ und Kofaktoren wie NADPH die Umsetzung von L-Arginin zu L-Citrullin und NO¹⁹⁸ (Abbildung 5).

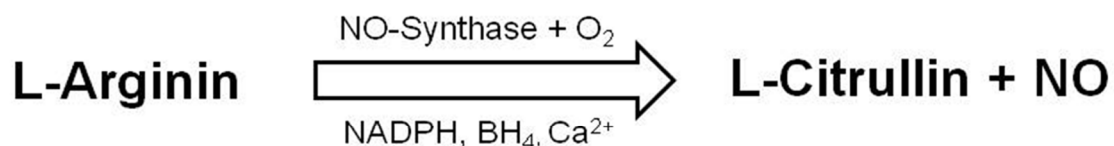


Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung der NO-Synthese.

Das endogen gebildete NO wirkt auf Gefäße stark vasodilatierend,^{189,190} indem es die Aktivität der löslichen Guanylat-Cyclase (sGC) erhöht, was gleichzeitig zu einem Anstieg des intrazellulären cGMP-Spiegels führt.²⁰⁷ In Abbildung 6 wird der NO-sGC-cGMP-Signaltransduktionsweg erläutert: Stickstoffmonoxid (NO) wird enzymatisch aus der Aminosäure L-Arginin durch drei Isoformen der NO-Synthase (eNOS, nNOS und iNOS), gewonnen. Geringe Mengen endogen produziertes oder exogen verabreichtes NO aktiviert die lösliche Guanylatzyklase (sGC), die GTP in zyklische GMP konvertiert, was verschiedene physiologische und gewebeprotective Effekte vermittelt. Der Abbau von cGMP in GMP wird durch mehrere Phosphodiesterase (PDE) Familien katalysiert. Exzessive Mengen von NO, gebildet unter pathologischen Bedingungen und assoziiert mit erhöhtem Entzündungsgrad sowie oxydativem Stress im Gewebe, können stark mit Superoxid-Anion ($O_2^- \bullet$) reagieren, das zu Peroxynitrit ($ONOO^-$) wird. Peroxynitrit, gemeinsam mit anderen Oxidationsmitteln, induziert Zellschäden durch Lipidperoxidation und ist verantwortlich für die Inaktivierung von Enzymen und anderen Proteinen durch Oxidation und Nitrierung. Es aktiviert die Matrix-Metalloproteasen (MMP) und das nukleare Enzym Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), das letztendlich zu zelluläre Dysfunktion und Tod führt. Der NO-sGC-cGMP-Signalweg kann durch Verringerung der Bioverfügbarkeit von NO (z.B. durch chemische Wechselwirkung von NO mit O_2^\bullet) oder durch Veränderung des Redox-Zustandes der sGC selbst beeinträchtigt werden (beispielsweise durch oxydativen Stress oder die Wirkung durch Peroxynitrit), wodurch es nicht mehr auf endogenes NO oder NO-freisetzende Arzneimittel reagiert.²⁰⁸

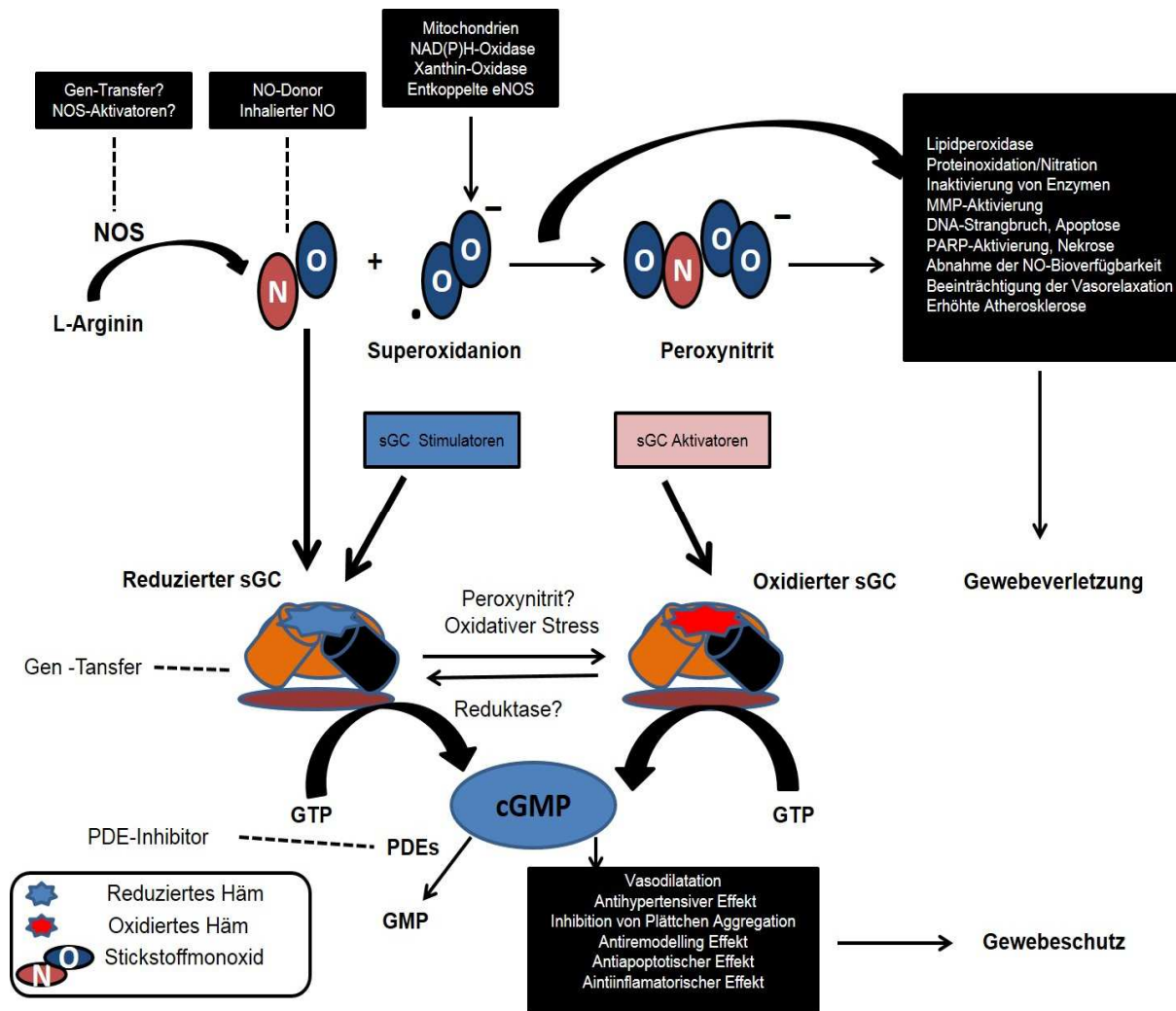


Abbildung 6. Der NO-sGC-cGMP-Signalübertragungsweg (Modifiziert nach Evgenov et al., Nature Reviews, 2006).

1.4.1 Stickstoffmonoxidsynthase (NOS)

Die NOS ist ein Isoenzym, das in drei Formen vorliegt: endotheliale NOS (eNOS oder NOS3), neuronale NOS (nNOS oder NOS1) und induzierbare NOS (iNOS oder NOS2). Diese Namen reflektieren den Gewebetyp, in dem die NOS-Enzyme zum ersten Mal beschrieben worden sind. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass jede dieser Isoformen auch in einer Vielzahl anderer Gewebe exprimiert werden kann.²⁰⁹ Die drei Isoformen sind sich ähnlich in Bezug auf Struktur und katalytische Mechanismen.¹⁹⁸ eNOS wird durch ein Gen kodifiziert, das auf Chromosom 7 lokalisiert ist. Es ist ein 135 kDa Protein, das aus 1294 Aminosäuren besteht. Es wurde das erste Mal in Gefäßendothelzellen identifiziert^{210,211} und später in andere Zelltypen vorgefunden,

wie z.B. in humanen neuronalen Zellen,²¹² humanen und Ratten-Astrozyten,^{213,214} humanen T-Zellen,²¹⁵ humanen Knochenmarkzellen, humanen Osteoblasten und Osteoklasten,²¹⁶ humanen dermalen Fibroblasten,²¹⁷ Ratten-Kardiomyozyten,²¹⁸ Ratten-Hepatozyten²¹⁹ und Kaninchen-Dickdarmzellen.²²⁰ Es wird konstitutiv exprimiert und existiert sowohl in einer membrangebundenen als auch in einer zytosolischen Form.¹⁹⁸ Obwohl eNOS im Wesentlichen ein durch Kalzium-Calmodulin-Komplex aktiviertes Enzym ist, wird es zusätzlich an endotheliale Rezeptoren,²²¹⁻²²³ wie z.B. den M3-Muskarinrezeptor oder B1-Bradykininrezeptor,²²¹ durch Hypoxie,^{222,223} "Shear stress"^{221,224,225} und Hormone wie z.B. Östrogen²²⁶ stimuliert. Durch die Stimulierung der Rezeptoren kommt es zu einer Erhöhung des Kalzium-Einstroms in die Endothelzellen. Dies bewirkt die Phosphorylierung, und damit die Aktivierung von membrangebundener und zytosolischer eNOS. Das so im Endothel produzierte NO diffundiert in die glatten Gefäßmuskelzellen und induziert dort die Gefäßrelaxation. Außerdem entfaltet es eine aggregationshemmende Wirkung auf Thrombozyten und beeinflusst so die Durchblutung sowie den Gefäßtonus.^{221,227} Die durch eNOS verursachte Vasodilatation ist in Arterien deutlich größer als in Venen.²²⁸ Die physiologische Konzentration des von eNOS produziertem NO liegt im picomolaren ($< 1\text{ nM}$),²³⁹ oder sub nanomolaren Bereich (ca. $1\text{-}30\text{ nM}$),²²⁹ und wird zur Signaltransduktion nur in kurzen Schüben hergestellt.²³⁰ Die neuronale NOS, ein 160 kDa Protein,^{231,232} welches auf Chromosom 12 kodiert wird,²³⁴ ist eine konstitutive NO-Synthase, die ähnlich dem eNOS abhängig von Ca^{2+} ist.¹⁹⁸ Immunhistochemische Untersuchungen haben nNOS in bestimmten Hirnregionen nachgewiesen wie Bulbus olfactorius, Lamina tecti, Gyrus dentatus des Hippocampus, Stria terminalis, diagonales Band von Broca, Hypophysenvorder- und -hinterlappen, Retina, Cerebellum und Hypothalamus, dort insbesondere in den Nuclei supraopticus und Nuclei paraventricularis.^{233,234} Darüber hinaus enthalten auch das Nebennierenmark und periphere Darmnerven nNOS. Letztere werden auch als „nitric Nerven“ bezeichnet.²³⁵ Es übernimmt auch die Funktion eines Neurotransmitters, der die Aktivität des sympathischen Nervensystems reguliert.^{236,237} Es ist auch an der Regulation von gastrointestinaler Motilität, Kontrolle glatter Muskulatur sowie neuroendokriner Prozesse beteiligt.²³⁷ Im Hirnstamm hemmt NO den Sympathikotonus und kann dadurch Blutdruck und Herzfrequenz senken.^{238,239}

Das iNOS-Gen ist lokalisiert auf Chromosom 17.¹⁹⁸ iNOS ist im Gegensatz zu den konstitutiven Isoformen eNOS und nNOS nicht ständig in aktiver Form im Gewebe vorhanden, sondern induzierbar.^{198,240} iNOS wurde erstmalig aus Makrophagen isoliert und wird in zahlreichen Geweben und Zellen exprimiert, wie z.B. Lunge, Muskelzellen, Epithelien und Leukozyten. Im Gehirn wird iNOS in Endothelzellen, Mikroglia und Astrozyten synthetisiert.^{198,241-245} iNOS ist Kalzium unabhängig und besitzt Calmodulin als prothetische Gruppe.²⁰⁰ Es ist permanent aktiviert und kann NO für längere Zeiträume erzeugen.²²⁹ Es ist ein Teil der unspezifischen Immunabwehr.²⁴⁶ Hier fungiert das von diesem Enzym produziertes NO als zytotoxischen Agens gegen Tumorzellen, Bakterien, Pilze und Protozoen.^{229,247} Dabei sind unzählige Stickstoff- und Sauerstoffverbindungen entscheidend für die Herstellung des zytotoxischen Milieus. Die Superoxide, die von der NADPH-Oxidase des Phagozyten hergestellt werden, reagieren mit NO unter Bildung von Peroxynitrit.^{229,248} Studien berichten von der Beteiligung von iNOS an der Regulation der renalen Funktion und des arteriellen Blutdrucks.²⁴⁹ Auch nach Verletzungen soll iNOS an der Gefäßerweiterung mit konsekutiver Hyperperfusion beteiligt sein.²⁵⁰ Die wesentliche Rolle der iNOS wird bei iNOS-Knockoutmäusen erkannt, die vor allem anfälliger für Infektionen sind.²⁵¹ Eine Hyperaktivität der iNOS kann bei verschiedenen Erkrankungen (z.B. Morbus Crohn) beobachtet werden. Im septischen Schock ist es verantwortlich für den ausgeprägten Blutdruckabfall aufgrund gesteigerter Vasodilatation und Multiorganversagen.²⁵² Anders als nNOS und eNOS, ist iNOS ein Enzym, dass über einen längeren Zeitraum NO in höheren Konzentrationen synthetisiert.²²⁹ Diese Konzentration befindet sich im nanomolaren (> 100 nM) Bereich.^{229,240}

1.5 NO im Gehirn

Das Gehirn verbraucht ca. 20 % der körpereigenen Energie, obwohl es nur 2% der Gesamtmasse des Körpers ausmacht. Eine der wichtigsten Aufgaben der zerebralen Zirkulation ist das Gehirn mit Sauerstoff und Glukose zu versorgen, denn die neuronale Aktivierung erfordert große Mengen an Energie, um den Ionenstrom zu regulieren, der durch Depolarisation entsteht. Daher ist eine streng regulierte Durchblutung essentiell.²⁵³ Der NO-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der zerebralen Durchblutung. Das Verständnis der Mechanismen, die diese Prozesse

steuern, können nützliche Einblicke in die CBF-Veränderung geben, die während einer Hirnverletzung auftreten. Zwei große Mechanismen liegen der Regulation des CBF zugrunde, die Autoregulation und die neurovaskuläre Kopplung.²⁵³ eNOS-NO hat eine Schlüsselrolle inne bei der Autoregulation, wogegen das nNOS produzierte NO entscheidend bei der neurovaskulären Kopplung ist.²⁵³ Nach Hirnschädigung sind diese NOS-Isomere in ihrer Funktionalität beeinträchtigt.²⁵⁴ Im Gehirn wird eNOS im vaskulären Endothel und Plexus choroideus exprimiert. Das NO, das vom eNOS stammt (eNOS-NO), spielt eine Schlüsselrolle für die Aufrechterhaltung der Mikrozirkulation,²⁵⁴ fördert die Vasodilatation, erhöht die zerebrale Durchblutung, hemmt die Thrombozyten-Aggregation und -Adhäsion,^{132,254,264} hemmt die Leukozytenadhäsion,^{255,256} verringert die Proliferation der glatten Muskulatur und hat u.a. eine antioxidative Wirkung.^{254,263} Das neuronale NO (nNOS-NO) agiert als ein wichtiger Neurotransmitter, der die neuronale Plastizität, Gedächtnisbildung, zerebrale Nerven, Systemdurchblutung, Übertragung von Schmerzsignale und Neurotransmitter-Freisetzung, Schlaf-Wach-Zyklus und Hormonausschüttung (z.B. Östrogen) reguliert.^{257,258,262,270} Anders als eNOS und nNOS, wird die Expressierung von iNOS durch Makrophagen, Gliazellen und Tumorzellen in Anwesenheit von Zytokinen, Endotoxinen und anderen inflammatorischen Agenzien bestimmt.²⁵⁹ Durch iNOS-Aktivierung werden große Mengen (100-1000 Fach höher) an NO, im Vergleich zu eNOS und nNOS, synthetisiert.²⁶⁰ Das aktivierte iNOS produziert kontinuierlich NO, bis das Enzym abgebaut ist.²⁶¹ Die NO-Funktion von eNOS und nNOS wird durch den NO-sGC-cGMP-Signalweg vermittelt.

1.5.1 NO in der frühen Hirnschädigung nach SAB

Pathologische Veränderung im Stickstoffmonoxid (NO)/Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS)-Weg treten früh nach SAB auf.^{140,143,262} Experimentelle Versuche deuten auf ein Mangel an NO hin, der nicht durch eine beeinträchtigte NO-Synthese zu erklären ist, da die gesamte NOS-Aktivität, während der ersten 90 Minuten nach SAB unverändert bleibt.²⁶³ Daher wird vermutet, dass die frühe Verringerung der zerebralen NO-Konzentration nach SAB deshalb zustande kommt, weil NO durch Oxyhämoglobin,²⁶⁴⁻²⁶⁶ durch Reaktion mit freien Radikalen,²⁶⁷ und der Reduzierung zu Nitriten²⁶⁸ deaktiviert wird. Dieser Effekt ist mit der Verringerung der zerebralen Durchblutung

vergesellschaftet.²⁶⁹ Daher werden dringend neue Therapien benötigt, die das zerebrale NO-Defizit und die dadurch bedingte Abnahme der zerebralen Durchblutung nach SAB verringern.²⁷⁰

1.5.2 NO-Donatoren

Stickstoffmonoxid-Donatoren (NOD) sind eine heterogene Gruppe von Medikamenten, deren gemeinsames Merkmal die Fähigkeit ist, NO oder eine NO-verwandte Spezies, wie das Nitrosonium-Kation (NO^+) oder Nitroxyl-Anion (NO^-), in vitro oder in vivo, freizusetzen.²⁷¹ Die Wirkung folgender NODs wurde experimentell oder klinisch nach SAB untersucht: Organische Nitrate (z.B. Nitroglycerin, Isosorbid-5-Mononitrat, Nicorandil, Pentaerythritetranitrat); S-Nitrosothiole (z.B. S-Nitroso-N-acetylpenicillamin und S-Nitroso-Glutathion); Sydnominine (z.B. Molsidomin, SIN-1); NONOate (JS-K, SPERMIN-NONOat und Proli-NONOat), anorganische Nitrate (Natriumnitroprussid) und NO-Gas.^{272,273} Klassische NO-Donatoren, wie Natriumnitroprussid (SNP) und Nitroglycerin (GTN), können nicht als Routine-Therapeutika eingesetzt werden, da sie schwerwiegende Nebenwirkungen besitzen.²⁷² Zwar verursachte SNP im Tierversuch eine effektive Vasodilatation zerebraler Gefäße, diese Wirkung war jedoch mit Hypotension und Hirnödem vergesellschaftet.^{274,275} Intrathekale Behandlung mit SNP ruft, in der Mehrzahl der Fälle, neben der positiven Wirkung auf Gefäßdurchmesser, Übelkeit, Erbrechen, Migräne, Kopfschmerzen, Herzrhythmusstörung, unkontrollierten Anstieg der zerebralen Durchblutung (CBF) und Zyanid-Vergiftung als Nebenwirkung hervor.²⁷⁶ GTN ist ein NO-Donator, der häufig zur Behandlung von Angina pectoris verwendet wird. Nach SAB bei Primaten führte GTN zur Auflösung von Makrovasospasmen.²⁷⁷ Transdermale Verabreichung von GTN bei Menschen erhöhte nach SAB die transkranielle Doppler (TCD) Geschwindigkeit und den CBF.²⁷⁸ Auch das klinische Outcome verbesserte sich, und das DIND reduzierte sich.²⁷⁹ In allen Studien trat allerdings eine ausgeprägte systemische Hypotension als Nebenwirkung auf. Dies schränkt den klinischen Einsatz dieser vielsprechenden Substanz erheblich ein.²⁷² Die intrathekale Verabreichung von GTN führte experimentell zu einer vasodilatativen Wirkung, ohne dass dadurch eine systemische Hypotonie hervorgerufen wurde.²⁸⁰ Allerdings wurde die Sicherheit und Wirksamkeit intrathekaler Anwendung am

Menschen noch nicht getestet.²⁷² Die genannten Eigenschaften und Mängel der klassischen NO-Donatoren veranlassten die Suche nach neuen NO-Donatoren (NONOate, S-Nitrosothiole, Natriumnitrite, Sydnominen, NO-Gas), die in experimentellen und klinischen Studien hinsichtlich ihres Potentials zur Vasospasmus Behandlung, nach SAB, getestet werden.²⁷² S-Nitrosothiole (z.B. S-Nitrosoglutathion) weisen nach experimenteller SAB, eine vasodilatative Wirkung auf zerebrale Arterien auf. Außerdem hat dieser NO-Donator keinen Effekt auf die ICP und CPP. Jedoch weist es Nebenwirkungen bzgl. systemische Blutdruckverminderung auf.¹⁴⁰ Auch NANOate weist eine relaxierende Wirkung auf die verengten zerebralen Gefäße auf.^{281,282} Als Nebenwirkung wird durch NANOate die systemische Hypotension,²⁸³ und die Hepatokarzinogenität, durch N-Nitrosopyrrolidine, gefördert.²⁸⁴ Experimentelle Studien zeigen, dass Sydnominen, wie z.B. Molsidomin, einen gefäßrelaxierenden und einen antithrombotischen Effekt auf die Mikrozirkulation aufweist. Auch hier zeigte sich allerdings eine ausgeprägte Hypotension (um ca. 18,5 mmHg).²⁸⁵ Natriumnitrit, das für die Phase-2a an aSAB-Patienten untersucht wird, ist ein Medikament, das zerebrale Vasospasmen verbessert.²⁸⁶ Es weist jedoch in klinischen Studien ebenfalls für NO-Donoren typische Nebenwirkungen auf.²⁸⁷

1.5.3 Inhaliertes NO

Inhaliertes NO (iNO) wird seit 1991 als selektiver pulmonaler Vasodilatator verwendet, um pulmonale Hypertonie zu behandeln.^{288,289} Der Vorteil von iNO liegt in der sofortigen relaxierenden Wirkung auf pulmonale Widerstandsgefäße, so dass es keinen systemischen hypotonen Nebeneffekt hervorruft.²⁹⁰⁻²⁹³ iNO hat auch extrapulmonale Effekte, z.B. verringert es den ischämischen Reperfusionsschaden im mesenterialen und myokardialen Gewebe.^{294,295} In experimentellen²⁹⁶⁻²⁹⁸ und klinischen²⁹⁹ Studien wurden keine Veränderungen der zerebralen Durchblutung (CBF) und der zerebralen Perfusion (CPP) an gesunden Tieren und Menschen dokumentiert.³⁰⁰ Jedoch verursacht iNO nach experimenteller zerebraler Ischämie, eine selektive Erweiterung der zerebralen Gefäße der ischämischen Penumbra, ohne dass dabei der systemische Blutdruck abfällt. Es steigert die zerebrale Durchblutung, verbessert das neurologische Outcome, und verhindert den ischämischen Zelltod.²⁷⁰ Aufgrund des Wirkmechanismus von iNO, könnte es möglicherweise eine vielverspre-

chende Behandlungsstrategie zur Vorbeugung des frühen Hirnschadens nach SAB darstellen.³⁰¹

1.5.4 Rolle des NOs in der zerebralen Autoregulation

Die Zerebrale Autoregulation (CA) ist ein homöostatischer Prozess bei dem Widerstandsgefäße erweitert oder verengt werden, um die zerebrale Durchblutung (CBF) konstant zu halten.^{302,303} Es werden zwei Haupttypen von CA unterschieden: a) Stoffwechselregulation, die durch Veränderungen der Hirnstoffwechselrate angetrieben wird³⁰⁴ und b) Druckregulation, die durch eine Antwort des CBF auf arterielle Blutdruck-Veränderungen charakterisiert wird.³⁰⁵⁻³⁰⁹

Bei gesunden Erwachsenen wirken sich Veränderungen des systemischen Blutdrucks (MAP), zwischen 60-160 mmHg, geringfügig oder gar nicht auf den CBF aus.^{302,310,335} Sobald der MAP ansteigt, konstringieren die kleinen zerebralen Arterien und Arteriolen und sorgen dadurch für eine Aufrechterhaltung des CBF.³¹¹ Umgekehrt, dilatieren die zerebralen Widerstandsgefäße sobald der systemische Blutdruck abfällt. Auch dadurch wird der CBF konstant gehalten. Jenseits der autoregulatorischen Grenzen, hängt die CBF direkt von MAP/CPP ab; eine arterielle Hypotonie führt zur Mangeldurchblutung des Gehirns und ggf. Bewußtseinsverlust, während eine ausgeprägte arterielle Hypertonie zur Öffnung der Blut-Hirn-Schranke und zum Hirnödem führen kann.³¹¹

Die metabolische Regulation der Hirndurchblutung erfolgt über den arteriellen $p\text{CO}_2$.^{312,313} Bei gesunden Erwachsenen steigt im Bereich zwischen 25-75 mmHg der CBF linear um 2-4% pro mmHg PaCO_2 an und die zerebralen Gefäße dilatieren.^{335,336} Veränderungen in der zerebralen Zirkulation treten bei gesunden Menschen unter den genannten Bedingungen innerhalb weniger Sekunden ein.³¹²

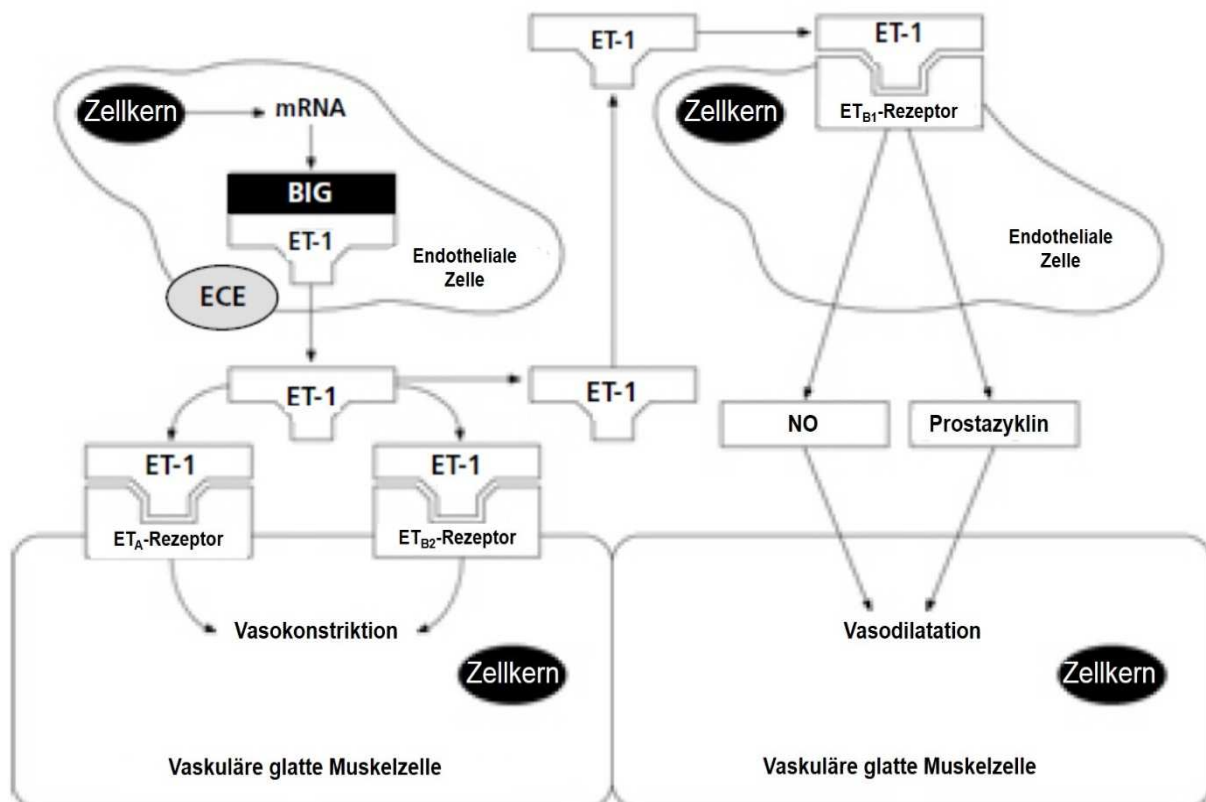
Nach SAB sind autoregulatorische Mechanismen der zerebralen Durchblutung häufig beeinträchtigt. Die Druckregulation, die Fähigkeit des CBF auf den veränderten systemischen Blutdruck zu reagieren, wie auch die CO_2 -Reaktivitätsfähigkeit der zerebralen Gefäße bleiben aus.^{128,131,132,142,314,315} Experimentell tritt eine schwere autoregulatorische Störung innerhalb von zwei bis drei Stunden nach SAB auf und hält bis zu drei Monate an.¹²⁶ Klinisch tritt diese Beeinträchtigung in den meisten Fällen innerhalb der ersten 72 Stunden nach aneurysmatischer SAB auf und korreliert in ihrer

Ausprägung mit der Schwere der SAB.³¹⁵ Die genauen Mechanismen der aufgehobenen CO₂-Reaktivität nach SAB sind nicht bekannt. Diskutiert wird u.a. eine Entkopplung der eNOS.³¹⁶⁻³¹⁸ Die funktionelle Entkopplung des eNOS vom Kofaktor Tetrahydrobiopterin (BH₄) geschieht unter ischämischen Bedingungen und ist für die Erzeugung von Superoxid, anstatt NO, verantwortlich.^{319,320} Das Superoxid reagiert mit NO zu toxischem Formperoxynitrit. Durch diese NO-Depletion verschärft sich die Verringerung der zerebralen Durchblutung nach SAB und der neuronale Schaden wird verstärkt. Die Gabe von L-Arginin- oder Pravastatin haben einen positiven Effekt auf die zerebrale Autoregulation nach SAB.^{321,322} Weitere Untersuchungen müssen zeigen, wie die gestörte Autoregulation nach SAB erfolgreich behandelt werden kann.

1.6 Rolle von Endothelin und Endothelin-Rezeptoren nach SAB

Endothelin wurde 1988 von Yanagisawa und Mitarbeiter entdeckt.³²³ Es wurde von Aortenendothelzellen vom Schwein isoliert, charakterisiert und kloniert.³²³ Endotheline sind Oligopeptide, die in drei Isoformen auftreten: ET-1, ET-2 und ET-3.³²⁴ Sie bestehen aus 21 Aminosäuren und werden hauptsächlich in Endothelzellen hergestellt. Endothelin-1 (ET-1) ist der stärkste bisher bekannte Vasokonstriktor.³²⁵ Die ET-1-Synthese wird reguliert durch physikalisch-chemische Faktoren³²⁶ (z.B. Hypoxie), durch Vasokonstriktoren,^{327,328} Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF),³²⁹ pH,³⁹¹ Zytokine³³⁰ und Adhäsionsmoleküle.³³¹ Diese induzieren die Transkription von ET-1-mRNA und damit die innerhalb von Minuten einsetzende Synthese und Sekretion von ET-1. Die Halbwertszeit der ET-1-mRNA beträgt etwa 15-20 Minuten und die Plasmahalbwertszeit für ET-1 beträgt 4-7 Minuten.³³² Diese schnelle Regulation erlaubt den Endothelzellen, die ET-1-Syntheserate rasch zu verändern und somit den Gefäßtonus schnell zu regulieren. Endothelzellen sezernieren 75-90% ihrer ET-1-Produktion in das abluminale Interstitium,^{333,334} wo es mit Endothelinrezeptoren auf den Gefäßmuskelzellen und perivaskulären Nervenzellen interagiert. Nur 25% der ET-1 Gesamtproduktion wird in die Blutbahn sezerniert. Die Plasma-Konzentration von ET-1 liegt im picomolaren Bereich,³³⁵ während die Schwellen-Konzentration für die ET-1 induzierten Vasokonstriktionen meist im nanomolaren Bereich liegt.³³⁶ Seine Wirkung wird über drei Rezeptoren vermittelt: Der ET_A-, ET_{B1}- und ET_{B2}-Rezeptor.³³⁷ Diese Rezeptoren sind an die Phospholipase-C via GTP-Binding-Protein gekoppelt.³³⁸

Die Vasokonstriktion wird vor allem durch ET_A -Rezeptoren vermittelt, die besonders stark in glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert werden, während ET_{B1} -Rezeptoren auf Endothelzellen exprimiert werden, und eine durch NO vermittelte Vasodilatation bewirken. ET_{B2} -Rezeptoren, die in einem sehr geringen Umfang in glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert werden, vermittelt ebenso wie die ET_A -Rezeptoren eine Vasokonstriktion (Abbildung 7).^{338,339,382,340}



Big ET-1 = Big Endothelin-1; ECE = Endothelin Converting Enzym

Abbildung 7: Vaskuläre Wirkung von Endothelin-1 (ET-1) (Modifiziert nach Agapitov et al., Jraas, 2002).

Der Signaltransduktionsweg für die ET_A -Rezeptoren führt über eine Aktivierung heterotrimerischer G-Proteine ($G_{q/11}$) und Phospholipase-C (PLC) zu einer Freisetzung von Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). IP_3 aktiviert IP_3 -Rezeptoren (IP_3R), die sich in den Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) befinden. Wird IP_3 an diese Membranproteine gebunden, wirken sie wie Ca^{2+} -Kanäle und Ca^{2+} fließt

seinem Konzentrationsgradienten folgend aus dem SR in das Zytosol. Der daraus resultierende Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol aktiviert die Calmodulin (CaM) abhängige Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK), die über eine Phosphorylierung der regulatorischen leichten Ketten des Myosins (MLC_{20}) die Konstriktion einleitet.^{341,342} Für eine schematische Verfolgung des ET_A -Rezeptor-Transduktionsweges siehe Abbildung 8.

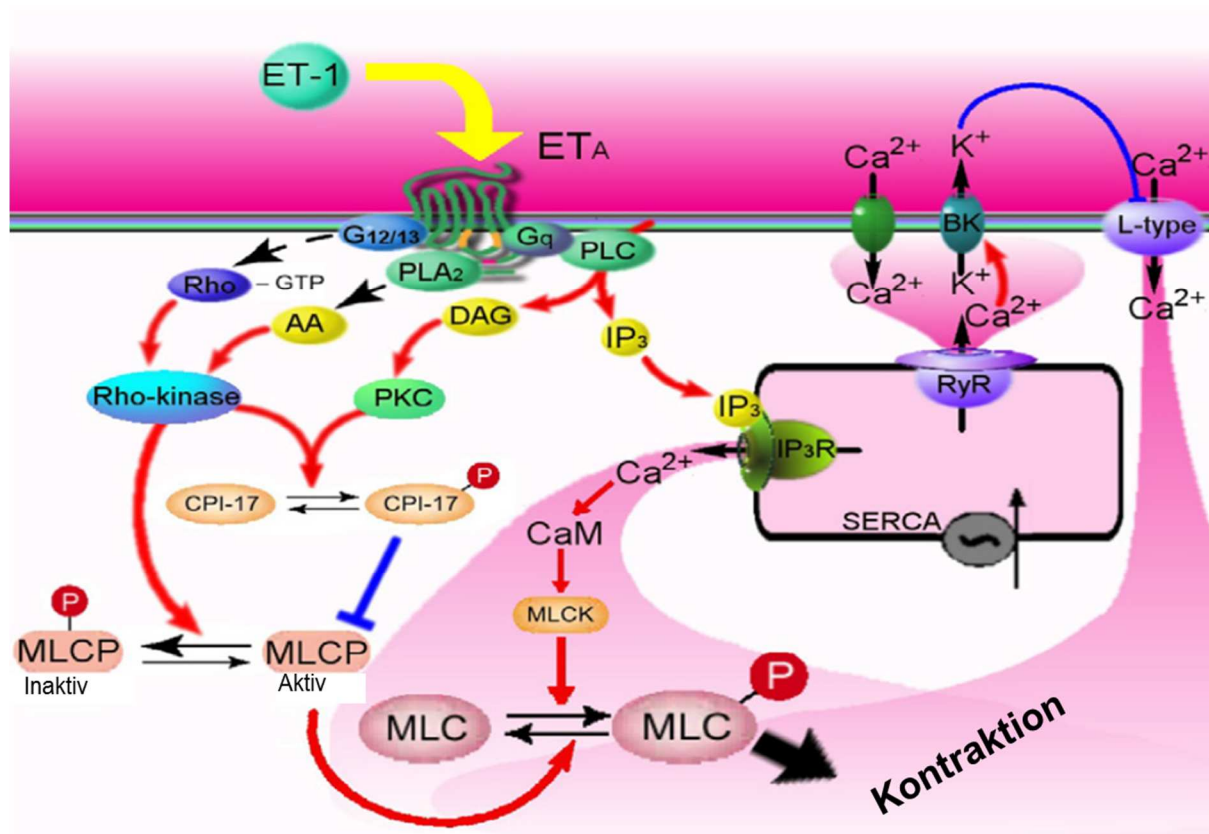


Abbildung 8: Postuliertes Modell der Signaltransduktionswege von ET_A -Rezeptoren an glatten Gefäßmuskelzellen.

AA = Arachidonsäure; PLA_2 = Phospholipase A_2 ; BK = Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle; DAG = Diacylglycerol; IP_3 = Inositol Triphosphat; IP_3R = IP_3 -Rezeptor; L-type = L-type Ca^{2+} -Kanäle; PLC = Phospholipase C; RyR = Ryanodine Rezeptor; SERCA = sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase.

Eine Reihe von Untersuchungen, die in den letzten Jahren durchgeführt wurden zeigen, dass Endothelin-1 (ET-1) maßgeblich an der Pathogenese von zerebralen Vasospasmen nach aneurysmatischer Subarachnoidalblutung (aSAB) bei Patienten beteiligt ist.³⁴³⁻³⁴⁷ Weitere Studien zeigen, dass die Expression von ET-1 vor allem in

den ersten 72 Stunden nach SAB, verstärkt stattfindet.^{343,348,349} Dieses Ereignis wird durch Thrombin und Oxyhämoglobin gefördert.^{350,351} Auch ist ein erhöhter ET-1-Spiegel möglicherweise für die Beeinträchtigung der NO-Produktion nach SAB verantwortlich. Diese Beeinträchtigung wird über die isoformspezifischen Protein-Kinase-C (PKC)-vermittelte Hemmung der eNOS-Expression vermittelt.³⁵² Präklinische Studien legen nahe, dass ET_A-selektive Antagonisten, wie z.B. Clazosentan, Makrovasospasmen nach SAB auflösen können. Dies konnte auch in einer randomisierten Phase-II-Studie an aSAB-Patienten gezeigt werden,^{353,354,355} In den darauffolgenden Multizenterstudien zeigte sich allerdings keine signifikante Reduktion von DIND, sowie keine Verbesserung des neurologischen Outcomes.^{178,353,354,356-359} Die Ergebnisse legen nahe, dass der verzögert auftretenden Makrovasospasmus nach SAB keine kausale Rolle für die post-hämorrhagische Ischämie spielt, sondern möglicherweise andere Mechanismen, wie z.B. eine Störung der zerebralen Mikrozirkulation hier eine weit wichtigere Rolle einnimmt. Ob ET-1 möglicherweise auch an Störungen der zerebralen Mikrozirkulation nach SAB beteiligt ist, ist bisher allerdings völlig unklar.

1.7 Ziel der Arbeit

Das Ziel der Arbeit ist die Untersuchung der Ätiologie der zerebralen Mikrozirkulationsstörung nach experimenteller Subarachnoidalblutung. Die von unserer Arbeitsgruppe erstmalig systematisch untersuchten Makrovasospasmen sind ein in der Frühphase nach Blutung auftretendes Phänomen, das sowohl beim Patienten, als auch nach experimenteller Blutung auftritt, und das wahrscheinlich entscheidend zur frühen mikrozirkulatorischen Dysfunktion und somit zum posthämorrhagischen ischämischen Hirnschaden nach SAB beiträgt. Wie oben erläutert, könnten der Stickstoff-Monoxid-Stoffwechsel, sowie Endothelin eine Schlüsselrolle in der Entwicklung der mikroarteriellen Konstriktion spielen. Deswegen wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation nach experimenteller Subarachnoidalblutung der Einfluss von inhaliertem Stickstoffmonoxid, sowie die Endothelin-Rezeptor-Blockade auf die zerebrale Mikrozirkulation untersucht.

2. Material & Methoden

Die Experimente und Datenanalyse wurden von Januar 2011 bis März 2014 am Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin durchgeführt. Alle tierexperimentellen Protokolle wurden von der zuständigen Behörde genehmigt (Regierung von Oberbayern, Tierversuchsantrag: 55.2-1-54-2531-**66/08**). Die Planung, Ausführung, Auswertung und Dokumentation der Versuche erfolgte nach den ARRIVE-Richtlinien.³⁶⁰ Die Randomisierung erfolgte mittels Los-Zug, alle Versuche wurden von einem verblindeten Untersucher durchgeführt und ausgewertet.

2.1 Material

Die Hersteller aller verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien in der vorliegenden Arbeit sind in der Folge aufgelistet.

2.1.1 Geräte

Tabelle 5: Geräte

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Gefäß-Kauterisierer	Fine Scientific Tool GmbH, Heidelberg, D
Blut-Gas-Analysator	Rapilab 1265, Global Siemens Healthcare Headquarters, Siemens AG, Erlangen, D
Bohrer-Ansatz	Aeskulap GD 8730 R, 0,5 x 5,1 mm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Diamantbohrer zur Trepanation	Rewatronik Products; Wald Michelbach, D
OP-Mikroskop	Carl Zeiss AG; Oberkochen, D
Druckwandler	DTX-Plus DT-XX, Becton-Dickinson, Medical, Heidelberg, D

Heizplatte	FHC, Bowdoinham, ME, USA
ICP-Monitor	Codmann, Boston, USA
ICP-Sonde (Codmann Microsensor)	Codman, Norderstedt, D
Inkubator	Modell 7510, Drägerwerk AG Lübeck, Lübeck, D
IVM-Mikroskop	Modell MST 49, Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, D
Kleintierrespirator	Mini Vent Typ 845, Hugo Sachs Elektronik, March, D
Laserdoppler	Perimed Instruments GmbH, S
Mikrokapnometer	CI 240, Columbus Instruments, Ohio, USA
Mikrokapnometer-Sonden (10 und 20 ml)	CI 240, Columbus Instruments, Ohio, USA
Multi Gas Monitor zur NO-Messung	Industrial Scientific Corporation, Dortmund, D
Perfusor segura	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Perfusor (Sp 100i, Syringe pump)	Corcom, USA
Sauerstoffgehaltmesser	Oxidig, Drägerwerk AG Lübeck, Lübeck, D
Signal-Transducer-Gerät	Hugo Sachs Elektronik, March, D
Signalanschlussbox	Bedo Elektronik GmbH, Krefeld, D
Stereotaktische Halterung	Mod. 51600, Stoeting Co., Wood Dale, IL, USA
Waage	Ohaus Corporation, CH

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Nahtmaterial zur Hautnaht	Ethibond 5-0, Ethicon, Norderstedt, D
Faden zur Perforation	Prolene 5-0, Ethicon, Norderstedt, D
Katheter (Außendurchmesser: 0,61 mm & Innendurchmesser: 0,28 mm)	Smiths Medical, Keene, USA
Kleberhärter (Insta-Set)	Drechsel & Mehr, Weiden, D
	Engmann, Viernheim, D
Knochenzement (Poly-Plus Bondex)	Dentsply Dentry, Konstanz, D
Mikrochirurgische Gefäßclips	Peter Lazig GmbH, Tuttlingen, D
OP-Besteck	FST, Berlin, D
Sekundenkleber (Maxi-Cure)	Drechsel & Mehr, Weiden, D
Skalpell (N°11 & N°20)	Feather Safety Razorco.LTD, Okasaka, J
Hemodynamic Monitoring System	Spectramed, Deutschland
Tubus (zur Intubation)	Insyte ^R , Decton Dickinson, USA
Gewebekleber - 3 M Vetbond (Tissue Adhesive)	3 M Animal Care Products, St. Paul, USA

2.1.3 Inhalationsgase

Tabelle 7: Inhalationsgase

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
CO ₂ (10 %ig, 10,0 L), UN 1956	Linde AG, Pullach, D
CO ₂ (99%, 13,4 L) UN 1013	Linde AG, Pullach, D
NO in N ₂ (Prüfgas, 268 mg/m ³ Stickstoffmonoxid (200 ppm), Rest Stickstoff); 10,0 L, RAL 6018	Linde AG, Pullach, D

2.1.4 Chemikalien

Tabelle 8: Chemikalien

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Atipamezolhydrochlorid (2,5 mg/kg KG)	Orion Pharma GmbH, Hamburg, D
Bepanthen (Augen & Nasensalbe)	Bayer Vital, Leverkusen, D
Clazosentan	Actelion, Allschwil, CH
D-PBS (mit CaCl ₂ und MgCl ₂)	Gibco, Invitrogen Life Technologies, Grand Island , NY, USA
Fentanyl	Jan Seen Cilag, Neuss, D
FITC-Dextran (Mw: 150.000 Da)	Sigma Chemicals, Deisenhofen, D
Flumazenil	Hikma Pharma GmbH, Niederolm, D
Heparin	RathioPharm GmbH, Ulm, D

Isofluran	Abbot GmbH & Co. KG; Wiesbaden, D
	Engmann, Viernheim, D
Knochenzement (Poly-Plus Bondex)	Dentsply Dentry, Konstanz, D
Knochenzement (Aqualox)	Voco, Cuxhaven, D
Medetomidin	Orion Pharma GmbH, Hamburg, D
Midazolam	Roche, Basel, CH
NaCl – 0,9% Lösung –	Braun AG; Melsungen, D
	Baxter, Lessines, B
Naloxon-HCl	PharmaSelect, Hannover, D

2.1.5 Intravitalmikroskop-Ausstattung

Tabelle 9: Intravitalmikroskop-Ausstattung

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Filter: Anregungsfilter (Bandpassfilter: 450-490 nm) und Reflektionspassfilter (510 nm)	Leitz, München, D
Bewegungsregulator (Mikroskoptisch) - Phytron IX - C - T	Phytron Elektron Elektrik GmbH, Gröbenzell, D
Fluoreszenzepiluminatoren (L3, Poemopak)	Leica, München, D
Hitzefilter (7 mm)	Leitz, München, D
Kamera SIT (Restlichtkamera), C2400-08	Hamamatsu Photonics, Heersching, D

Kreutztisch	Leitz, München, D
Objektive (5 x, 20 x)	Leitz, Wetzlar, D
Sperrfilter (Bandpassfilter: 520-525 nm)	Leitz, München, D
Xenon-Lampe (75 W) – XBO 75 W/2	Leitz, München, D

2.1.6 Software

Tabelle 10: Software

<u>Anwendungsgebiet</u>	<u>Programm/Hersteller</u>
Leica - Bildbearbeitung /- Analyse, Video-Aufnahme an Intravitalmikroskop	Leica Application Suite (LAS), Leica Microsystems, Wetzlar, D
FlexPro - Auswertung von zerebraler Durchblutung (CBF) und Intrakra- niellem Druck (ICP), graphische Auswertung	FlexPro, Weisang, D
Graphische Darstellung, Statistik	SigmaPlot 12, Erkrath, D
Aufnahme von ICP, LDF und MAP	DaisyLab 5.0, meas X, Mönchengladbach , D
Bildbearbeitung	Adobe Photoshop 7.0, Adobe Systems GmbH, München, D
Statistische Auswertung, schriftliche Bearbeitung, Präsentation	Excel, Word, PowerPoint (Microsoft Office 2007, 2010), Redmond, WA, USA

Feinbewegung des Mikroskoptisches, 1µm Intervall steuerbar	Alpha com V3.4.2 (Phyntron Elektron), Gröbenzell, D
Messaufnahmesystem (LDF, MAP,ICP)	DASYLab ,National Instruments, München, D

2.1.7 Versuchstiere

Für die Versuchsreihen zur Untersuchung von inhaliertem NO und dem Endothelin-Rezeptor-Inhibitor Clazosentan wurden männliche C57 bl/6 Mäuse mit einem Gewicht von 20-24g und einem Alter von 6-8 Wochen verwendet (Charles River Laboratories, Kisslegg, D). Zur Untersuchung der Rolle der NOS wurden homozygot transgene nNOS^{-/-} (NOS-1, Stamm Nummer 2633, genaue Bezeichnung: B6; 129S4 Nos1tm1Plh/J), iNOS^{-/-} (NOS2, Stamm Nummer 2609, genaue Bezeichnung: B6.129P2-Nos2tm1Lau/J) und eNOS^{-/-} (NOS-3, Stammnummer 2684, genaue Bezeichnung: B6.129P2-Nos3tm1Unc/J) Zuchtpaare gekauft (Jackson Laboratories, Maine, USA). Alle Mutationen wurden in Sv129-Zellen induziert, die resultierenden transgenen Tiere wurden 10 Generationen in C57 bl/6 Mäuse zurückgekreuzt. Eine Übersicht über die genauen Mutationen sowie den resultierenden Phänotyp gibt Tabelle 11. Die Zucht erfolgte homozygot. Die Tiere wurden nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll genotypisiert. Als Kontrolltiere wurden männliche C57 bl/6 Mäuse verwendet. Die Haltung der Tiere erfolgte im Walter-Brendel-Zentrum, entsprechend den erforderlichen speziellen Hygienebedingungen (FELASA erweitert).³⁶¹ Die Mäuse wurden bei einer Raumtemperatur von 22 ± 2°C in Standard Makrolon Käfigen (Gruppenhaltung bei Tieren mit > 20 g KGW = 5 Tiere / Käfig Typ II long) mit freiem Zugang zu Wasser und Futter bei einem Tag-Nachtrhythmus von 12 Stunden gehalten. Eine Stunde vor dem geplanten Versuchsbeginn wurden die Tiere in Einzelkäfigen nüchtern gestellt; die postoperative Haltung erfolgte in Einzelkäfigen.

Tabelle 11.: Übersicht über Mutation, Genotyp und Phänotyp der NOS-Knockout-Mäuse

Detailanalyse	NOS-1	NOS-2	NOS-3
Symbol	Nos-1 ^{tm1Ph}	Nos-2 ^{tm1Lau}	Nos-3 ^{tm1Unc}
Name	Stickstoffmonoxid-Synthase-1, neuronale Zellen; gezielte Mutation 1, Paul L Huang	Stickstoffmonoxid-Synthase-2, induzierbare Zellen; gezielte Mutation 1, Victor E Laubach	Stickstoffmonoxid-Synthase-3, endotheliale Zellen; gezielte Mutation 1, University of North Carolina
Synonyme	alphaNOS1, Kn, N2KO, nNOS ⁻ , nNOS ⁻ , nNOS KO, NOS ^{delta}	iNOS ⁻ , iNOS KO, NOS2 ⁻ , Nos2tm1Lau, NOS2tm/Lau	ecNOS ⁻ , eNOS ⁻ , eNOSKO, NOS3 ⁻
Gene	Lokalisierung: Chr5:117781032-117958840 bp, + Strang, genetische Position: Chr5, 57.29 cM, cytoband F	Lokalisierung: Chr11:78920787-78960254 bp, + Strang, genetische Position: Chr11, 46.74 cM	Lokalisierung: Chr5:24364810-24384474 bp, + Strang, genetische Position: Chr5, 11.32 cM
Eltern-Zelllinie	J1 (ES Cell)	E14TG2a (ES Cell)	E14TG2a (ES Cell)
Herkunft der Belastung	129S4/SvJae	129P2/OlaHsd	129P2/OlaHsd
Genotyp	Homozygot 2 (hm2)	Homozygot 2 (hm2)	Homozygot 2 (hm2)
Allelzusammensetzung	Nos1 ^{tm1Ph} /Nos1 ^{tm1Ph}	Nos2 ^{tm1Lau} /Nos2 ^{tm1Lau}	Nos3 ^{tm1Unc} /Nos3 ^{tm1Unc}
Genetischer Hintergrund	B6.129S4-Nos1tm1Plh/J	B6.129P2-Nos2tm1Lau/J	B6.129P2-Nos3tm1Unc/J
Herz-Kreislauf-System			verringerte vaskuläre endotheliale Zellzahl, anomaler systemischer arterieller Blutdruck, Verringerung der Herzmuskelkontraktilität, anormale Angiogenesis, u.a.
Zellular			erhöhte fetale Herzmuskelzell-Apoptose, erhöhte Nieren-Apoptose, verringerte Nierenzellproliferation, abnorme Redoxaktivität
Endokrine / Exokrinen Drüsen			abnorme Eierstock-Morphologie, kleinen Eierstock
Wachstum / Größe / Körperphänotyp	Abnahme des Körpergewichts		fetale Wachstumsverzögerung
Hämatopoetischen Systems			abnorme Osteoklasten Physiologie
Homöostase / Stoffwechsel			glomeruläre Kapillarthrombose, Anstieg des Serumharnstoffspiegels, erhöhter zirkulierender Kreatinkinasespiegel, Zyanose, u.a.
Immunsystem	verminderte entzündliche Reaktion	anormale Entzündungsreaktion, verminderte entzündliche Reaktion	abnorme Osteoklasten-Physiologie, erhöhte Entzündungsreaktion, Nierenentzündung
Sterblichkeit / Altern			partielle neonatale Letalität, teilweise postnatale Letalität
Muskel	vermindertes Skelettmuskelgewicht, beeinträchtigte Kontraktilität der Skelettmuskulatur, Muskelermüdung		verringerte Herzmuskelkontraktionsfähigkeit, erhöhte Herzkammer-Muskelkontraktilität
Nervensystem		anormales Gehirnwellenmuster	
Nieren / Harnwege			erhöhte Nierentubuli Apoptose, Albuminurie, Nierenmikroaneurysma, Mesangiolysis, abnorme glomeruläre Kapillarendothel-Morphologie, u.a.
Fortpflanzungsorgane			verminderte Befruchtungsfrequenz
Atmungssystem		anormale Tensid-Physiologie	Lungenblutungen, abnormen Lungengefäß-Morphologie, Lungengefäßstau, abnorme Tensidsekretion, u.a.
Verhalten/Neurologisch		anormaler Tagesrhythmus, anormales Schlafmuster	
Skelett			abnorme Osteoklastenphysiologie, verringerte Knochendichte, erhöhte Knochendichte, erhöhte kompakte Knochendichte, abnormale Osteoblasten-Physiologie

2.2 Methoden

2.2.1 Anästhesie und Antagonisierung

Die Mäuse werden nach einem Dosierungsplan (siehe Tabelle 12) gewichtsadaptiert intraperitoneal mit einer Kombinationsanästhesie aus Medetomidin (0,5 mg/kg KG), Midazolam (5 mg/kg KG) und Fentanyl (0,05 mg/kg KG) narkotisiert, da diese Kombination die zerebrale Vasomotorik nicht verändert.³⁶² Das Versuchstier gilt als betäubt, sobald der Standreflex ausfällt und an der Hinterpfote keine Schmerzreaktion ausgelöst werden kann. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wird alle 60 Minuten ein Drittel der initialen Dosis intraperitoneal appliziert. Zur Beendigung der Narkose wird die Anästhesie mit Atipamezol (2,5 mg/kg KG), Flumazenil (0,5 mg/kg KG) und Naloxon (1,2 mg/kg KG) antagonisiert (siehe Tabelle 13). Für die Intravitalmikroskopie werden die Tiere erneut intraperitoneal mit der oben beschriebenen 3-Fach-Kombinations-Anästhesie betäubt.

Tabelle 12: Dosisplan einer gewichtsadaptierten intraperitonealen Kombinationsanästhesie

	Medetomidin Domitor	Midazolam Dormicum	Fentanyl Fentanyl	Medetomidin Domitor	Midazolam Dormicum	Fentanyl Fentanyl	Gesamt
mg/ml	1	1	0.05				
mg/kg KG	0.5	5	0.05				
g	mg	Mg	mg	ml	ml	ml	ml
20	0.0100	0.1000	0.0010	0.0100	0.100	0.0200	0.1300
21	0.0105	0.1050	0.0011	0.0105	0.105	0.0210	0.1365
22	0.0110	0.1100	0.0011	0.0110	0.110	0.0220	0.1430
23	0.0115	0.1150	0.0012	0.0115	0.115	0.0230	0.1465
24	0.0120	0.1200	0.0012	0.0120	0.120	0.0240	0.1560
25	0.0125	0.1250	0.0013	0.0125	0.125	0.0250	0.1625
26	0.0130	0.1300	0.0013	0.0130	0.130	0.0260	0.1690
27	0.0135	0.1350	0.0014	0.0135	0.135	0.0270	0.1755
28	0.0140	0.1400	0.0014	0.0140	0.140	0.0280	0.1820
29	0.0145	0.1450	0.0015	0.0145	0.145	0.0290	0.1885
30	0.0150	0.1500	0.0015	0.0150	0.150	0.0300	0.1950
31	0.0155	0.1550	0.0016	0.0155	0.155	0.0310	0.2015
32	0.0160	0.1600	0.0016	0.0160	0.160	0.0320	0.2080
33	0.0165	0.1650	0.0017	0.0165	0.165	0.0330	0.2145
34	0.0170	0.1700	0.0017	0.0170	0.170	0.0340	0.2210
1000	0.5000	5.0000	0.0500	0.5000	5.000	1.0000	6.5000

Tabelle 13: Dosisplan einer gewichtsadaptierten intraperitonealen Antagonisierung

	Atipamezol Antisedan	Flumazenil Anexate	Naloxon Naloselect	Atipamezol Antisedan	Flumazenil Anexate	Naloxon Naloselect	Gesamt
mg/ml	5	0.1	0.4				
mg/kg KG	2.5	0.5	1.2				
g	mg	mg	mg	ml	ml	ml	ml
20	0.0500	0.0100	0.0240	0.0100	0.1000	0.0600	0.1700
21	0.0525	0.0105	0.0252	0.0105	0.1050	0.0630	0.1785
22	0.0550	0.0110	0.0264	0.0110	0.1100	0.0660	0.1870
23	0.0575	0.0115	0.0276	0.0115	0.1150	0.0690	0.1955
24	0.0600	0.0120	0.0288	0.0120	0.1200	0.0720	0.2040
25	0.0625	0.0125	0.0300	0.0125	0.1250	0.0750	0.2125
26	0.0650	0.0130	0.0312	0.0130	0.1300	0.0780	0.2210
27	0.0675	0.0135	0.0324	0.0135	0.1350	0.0810	0.2295
28	0.0700	0.0140	0.0336	0.0140	0.1400	0.0840	0.2380
29	0.0725	0.0145	0.0348	0.0145	0.1450	0.0870	0.2465
30	0.0750	0.0150	0.0360	0.0150	0.1500	0.0900	0.2550
31	0.0775	0.0155	0.0372	0.0155	0.1550	0.0930	0.2635
32	0.0800	0.0160	0.0384	0.0160	0.1600	0.0960	0.2720
33	0.0825	0.0165	0.0396	0.0165	0.1650	0.0990	0.2805
34	0.0850	0.0170	0.0408	0.0170	0.1700	0.1020	0.2890
1000	2.5000	0.5000	1.2000	0.5000	5.0000	3.0000	8.5000

2.2.2 Mechanische Beatmung

Zur Aufrechterhaltung physiologischer Bedingungen erfolgt nach der Anästhesie die Intubation mit einer speziell angefertigten Kanüle (20G) mit Silikonmanschette zur Abdichtung der Stimmritze. Die Intubation erfolgt unter direkter visueller Kontrolle mit einem Mikroskop. Die korrekte Tubuslage wird mittels Mikrokapnometrie verifiziert. Nach erfolgreicher Intubation wird das Tier mit einem Kleintier-Respirator verbunden und mit einem Gasgemisch aus 30% O₂ und 70% Stickstoff kontrolliert beatmet (Atemfrequenz: 140-200/min, Atemzugvolumen: 200-225 µl). Die Sauerstoffkonzentration, die Beatmungsparameter und der endexpiratorische CO₂-Partialdruck (p_{ET}CO₂) werden kontinuierlich überwacht, die Atemparameter ggf. angepasst. Angestrebt wird ein p_{ET}CO₂-Wert zwischen 35-45 mmHg. In einer vorherigen Publikation unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die p_{ET}CO₂-Werte sehr gut mit dem im Blut gemessenen pCO₂-Werten übereinstimmen, sodass dass über die gesamte Versuchsdauer ein physiologischer pCO₂ vorherrschte.³⁶²

2.2.3 Regelung der Körpertemperatur

Die Körpertemperatur der Maus wird mit einer rektalen Temperatur-Sonde gemessen und mit Hilfe einer rückgekoppelten Heizmatte konstant auf 37°C gehalten. Bei chronischen Versuchen werden die Tiere nach Versuchsende bis zu 24 Stunden in einem auf 34°C aufgewärmten Inkubator gehalten, um eine Hypothermie zu vermeiden.

2.2.4 Messung des intrakraniellen Drucks (ICP)

Die ICP-Sonde wird zunächst in physiologischer Kochsalzlösung geeicht. Nach Induktion der Narkose wird das Versuchstier in Bauchlage positioniert und die Kopfhaut medial ca. 1 cm längs inzidiert. Nach Entfernen der Galea aponeurotica wird der rechte Musculus temporalis dargestellt, inzidiert und stumpf nach lateral gedrängt. Orientierend wird die durchschimmernde Arterie cerebri media aufgesucht. Caudal davon erfolgt eine Bohrlochtrepantation mit einem Präzisions-Diamantenbohrer. Anschließend wird die ICP-Sonde epidural eingebracht. Die Sonde wird mit Knochenzement fixiert und es erfolgt die Aufzeichnung einer Baseline über 10 bis 30 Minuten, bevor der Versuch fortgesetzt wird.

2.2.5 Messung der zerebralen Durchblutung (CBF)

Die regional zerebrale Durchblutung (regional cerebral blood flow, rCBF), wird nicht-invasiv durch die intakte Schädeldecke mit Laser-Doppler-Fluxmetrie gemessen.^{363,364} Dazu wird das Versuchstier in Bauchlage positioniert und der linke Musculus temporalis freigelegt. Dieser wird im Bereich der Ansatzsehne inzidiert und stumpf nach lateral gedrängt. Anschließend wird die LDF-Sonde in einem 90° Winkel zur Kalotte über dem Versorgungsgebiet der A. cerebri media angesetzt und mit Gewebekleber befestigt. Die Laser-Doppler-Fluxmetrie misst über den Dopplershift die Geschwindigkeit der zerebralen Durchblutung. Durch die Absorption des eingestrahnten Laserlichtes wird die Erythrozytenkonzentration im jeweiligen Messvolumen bestimmt.³⁶⁵ Das Produkt aus beiden Werten wird in Perfusions-einheiten (Arbitrary Units, UA) angegeben. Es wurde zunächst unter Ruhebedingungen zehn Minuten eine Baseline aufgezeichnet. Diese wurde mit 100%

gleichgesetzt; die weiteren CBF-Werte wurden dann in Relation zu dieser Ruhedurchblutung als Prozent des Ausgangswertes dargestellt.^{315,316,365}

2.2.6 Induktion einer Subarachnoidalblutung (SAB)

Die SAB wird durch Fadenperforation der A. cerebri media induziert. Es handelt sich hierbei um ein modifiziertes Modell welches 1995 zum ersten Mal von Bederson für die Ratte beschrieben und in unserer Arbeitsgruppe reproduzierbar auf die Maus übertragen wurde.¹²⁷ Hierfür wird auf der linken Seite in der Medioclavikularlinie ein Hautschnitt ab dem oberen Teil des Sternums bis zur Mandibula ausgeführt. Im Hautschnittbereich ist die Glandula sublingualis zu erkennen, diese wird stumpf abpräpariert, um die A. carotis communis darzustellen. Nach Darstellung der Carotis-Bifurkation wird zunächst die A. thyroidea ligiert. Anschließend wird die Arteria carotis externa ca. 0,3 cm distal der Bifurkation ligiert. Dann wird ein Ligaturfaden ca. 0,1 cm distal der Bifurkation vorgelegt. Nach temporären Clipping der Arteria carotis communis wird die A. carotis externa mit einer Mikroschere zwischen den beiden Ligaturen geöffnet und ein 3,0 cm monofiler Faden eingeführt. Anschließend wird dieser Perforationsfaden mit der vorgelegten Ligatur fixiert und das Gefäß damit abgedichtet. Nach Entfernung des Clips wird der Perforationsfaden über die Arteria carotis externa in die Arteria carotis interna vorgeschoben. Unter kontinuierlicher Kontrolle der zerebralen Durchblutung und des intrakraniellen Drucks wird der Faden innerhalb der A. carotis interna nach intrakraniell vorgeschoben, bis er an der Media-Bifurkation das Gefäß perforiert. Die Auslösung der Blutung wird bestätigt durch einen abrupten massiven ICP-Anstieg (> 30 mmHg) und eine gleichzeitige drastische Verringerung der zerebralen Durchblutung (CBF) auf weniger als 30% des Ausgangswert. Nur wenn beide Kriterien erfüllt sind gilt die Blutung als erfolgreich ausgelöst.³⁶⁶ Hiernach wird der Perforationsfaden bis in die Arteria carotis externa zurückgezogen, und dieses Gefäß mit Hilfe der vorgelegten Ligatur anschließend verschlossen. Nach der SAB-Induktion erfolgte eine Beobachtungsphase von 15 Minuten, in denen der intrakranielle Druck und die zerebrale Durchblutung aufgezeichnet wurden. Dann erfolgt der Wundverschluss mit monofilem Faden in Einzelknopfnah-Technik. Bei der Sham-Operation werden alle Schritte außer der Perforation der A. cerebri media durchgeführt. Die Narkose wird antagonisiert, das Tier

nach Wiedererlangen der Reflexe extubiert und zur Weiterführung des Versuchs im Inkubator bei 34°C und 25% Luftfeuchtigkeit gehalten.

2.2.7 Jugularis-Katheter

Nach Positionierung des Versuchstiers auf dem Rücken wird mit der Pinzette auf der linken Seite in der Medioclavicular-Linie ein ca. 1 cm langer Hautschnitt durchgeführt. Die V. jugularis interna wird freipräpariert und möglichst weit cranial mit einem Seidenfaden ligiert. Die Zuflüsse zur Vene werden ligiert bzw. kauterisiert. Ein Haltefaden wird vorgelegt und das Gefäß nah am Übergang zur Vena subclavia temporär geklippt. Das Gefäß wird nun zwischen Clip und Ligatur inzidiert. Ein mit steriler Kochsalzlösung oder Therapiesubstanz vorgefüllter Katheter wird in das Lumen platziert und mit der Halteligatur fixiert. Nach Öffnen des Clips wird einmalig aspiriert, um die intravasale Lage des Katheters zu beweisen. Dann wird der Katheter mit einer weiteren Ligatur und mit Fibrinkleber fixiert. Der Katheter wird nun mittels subkutaner Tunnelung dorsal im Bereich des Nackens ausgeleitet, die Hautwunde mit monofilem Faden in Einzelknopfnah-Technik verschlossen.

2.2.8 Quantifizierung der Mikrozirkulation

2.2.8.1 Analyse des zerebralen Gefäßbaums anhand des Strahler-Schemas

Das Strahler-System wurde ursprünglich zur Quantifizierung der Geomorphologie von Tälern und Flusssystemen entwickelt.³⁶⁷ Heute wird es auch in den Biowissenschaften angewendet, um z. B. neuronale Netzwerke, Gefäßsysteme oder auch Bronchialverzweigungen zu kategorisieren,³⁶⁸⁻³⁷² also, um komplexe Systeme in vergleichbare Kategorien einzuteilen. Dieses System wurde an unsere Fragestellung angepasst,¹⁸⁴ um eine statistische Auswertung der Häufigkeit bzw. Anzahl von Mikrovasospasmen an Gefäßen zu ermöglichen. Die Gefäße, die sich nicht weiter aufteilen, werden als Kapillaren/(Gefäß-)Kategorie 0 bezeichnet, was einen Durchmesser von 5,0 bis 9,0 µm entspricht. Die Arteriolen (Gefäßdurchmesser 9,5-15 µm), aus welchen Kapillaren entstammen, werden als Kategorie 1 bezeichnet usw. Eine Übersicht sowie ein Echtbild zeigt Abbildung 9. Auf diese Weise werden für die vorliegende Studie nach dem Strahler-Schema alle Gefäße am Anfang der Versuchsreihe kategorisiert. Nach

Applikation des Fluoreszenzfarbstoffs und der Identifizierung der arteriellen Gefäße mittels der Flussrichtung werden zunächst die Kapillaren identifiziert. Danach werden diese retrograd bis hin zu den Gefäßen der Kategorie 6 (Gefäßdurchmesser: 55-65 μm) verfolgt. Die Buchstaben sollen die Gefäßabschnitte und die tiefgestellten Zahlen die Anzahl der Gefäßabschnitte einer einzelnen Kategorie definieren. Der gesamte Gefäßbaum im freipräparierten Fenster wird digital aufgezeichnet. Die weitere Auswertung erfolgte offline mit der Leica Application Suite (LAS) Software.

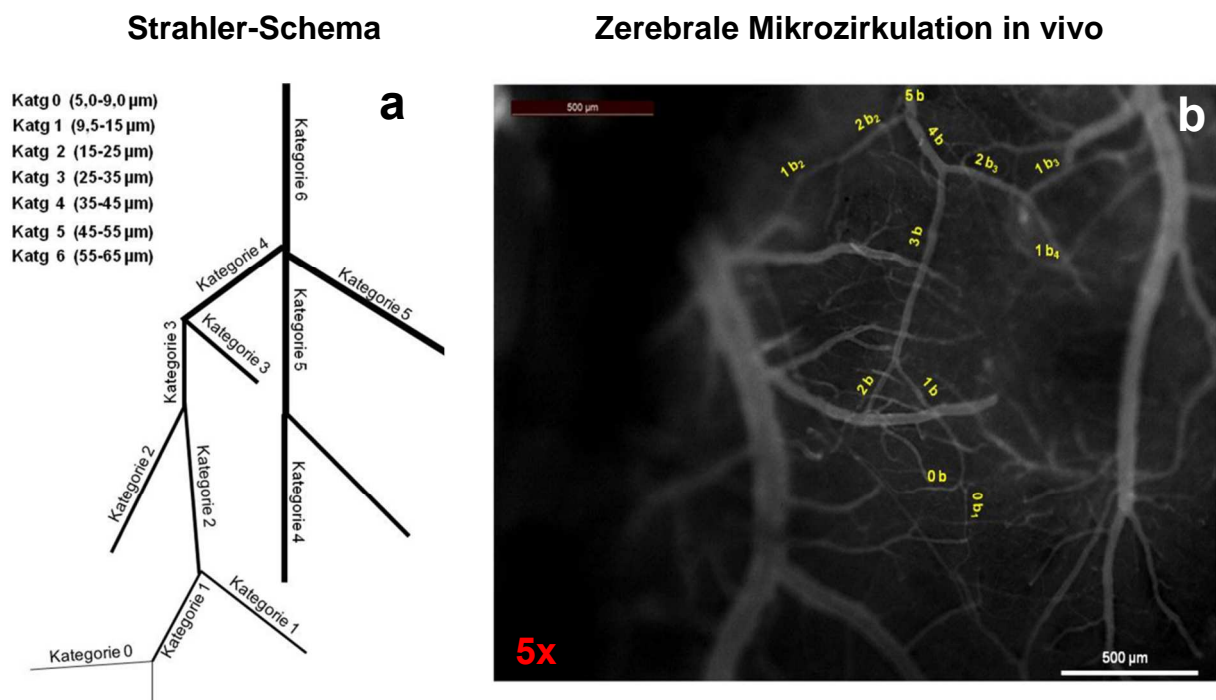


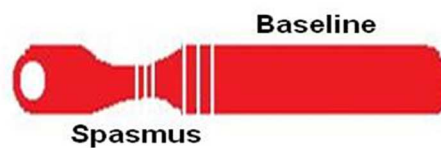
Abbildung 9: (a) zeigt eine schematische Darstellung eines Gefäß-Baums nach Strahler-Kategorien. (b) zeigt eine IVM-Übersichts-Aufnahme der zerebralen Mikrozirkulation. Die gelben Zahlen bezeichnen die Gefäßkategorien, die Buchstaben die Gefäßabschnitte und die tiefgestellten Zahlen die Anzahl der Gefäßabschnitte einer einzelnen Kategorie.

2.2.8.2 Quantifizierung von Gefäßdurchmesser und Mikrovasospasmus

Nach der Quantifizierung der einzelnen Gefäßabschnitte nach dem Strahler-Schema, folgt die Quantifizierung des Gefäßdurchmessers (Leica Application Suite (LAS), Leica Microsystems). In Bildern mit 20x Vergrößerung wird ein Gefäßabschnitt in

ganzer Länge gescannt, um kontrahierte und nicht kontrahierte Bereiche zu identifizieren. Abschnitte mit minimalem und maximalem Durchmesser werden dann markiert und im Abstand von 1 µm dreimalig gemessen. Aus diesen Messungen wird der Mittelwert gebildet. Der Grad der Konstriktion wird dann als Prozentwert der nicht-kontrahierten Gefäßabschnitte angegeben (Abbildung 10).

Arteriole



$$\text{Konstriktionsgrad (\%)} = (\text{Durchmesser des Spasmus} / \text{Durchmesser der Baseline}) \times 100$$

Abbildung 10: Schematische Darstellung der Bestimmung eines Vasospasmus an einer Arteriole. Die vertikalen Linien repräsentieren die Messpunkte zur Bestimmung des Gefäßdurchmessers im nicht kontrahierten und im kontrahierten Bereich. Als Konstriktionsgrad wird das Verhältnis beider Durchmesser bezeichnet.

2.2.9 Intravitalmikroskopie

2.2.9.1 Venöse und arterielle Katheterisierung der Maus

Die intravitalmikroskopische Untersuchung der zerebralen Zirkulation erfolgt drei Stunden nach Induktion der SAB. Vor Beginn der Intravitalmikroskopie wird zur kontinuierlichen Messung des arteriellen Blutdrucks die A. femoralis am linken Bein mit einem heparinisierten Kunststoffkatheter (Außendurchmesser: 0,61 mm; Innendurchmesser: 0,28 mm) cannuliert, der an einem Drucktransducer angeschlossen wird. Dieser wird vor Versuchsbeginn mit einem Quecksilber-Manometer geeicht. Der Katheter wird kontinuierlich mit 0,9% NaCl-Kochsalzlösung (0,4 ml/h) gespült, die Daten kontinuierlich aufgezeichnet. Am Ende eines jeden Versuchs wird eine Blut-Gas-Analyse durchgeführt. Zur intravenösen Applikation des Fluoreszenzfarbstoffs Fluoresceinisothiocyanat–Dextran (FITC-Dextran) und oder anderer Medikamente wird die linke V. femoralis in gleicher Art und Weise katheterisiert.

2.2.9.2 Kraniaelles Fenster

Das Versuchstier wird auf den Bauch gelegt und mittels Gaumenplatte in einem stereotaktischen Rahmen fixiert. Nach medianem Hautschnitt wird die Galea aponeurotica abpräpariert und das Periost entfernt. Mit einem Diamant-Präzisionsbohrer wird unter kontinuierlicher Kühlung mit isotoner Kochsalzlösung zur Vermeidung von Hitzeentwicklung links parietal über dem Stromgebiet der A. cerebri media ein 2 x 2 mm großes kraniaelles Fenster präpariert. Eine schematische Darstellung zeigt Abbildung 11. Bei der Trepanation wird besondere Sorgfalt darauf verwendet, die Dura mater nicht zu verletzen; Versuchstiere mit verletzter Dura mater werden vom Versuch ausgeschlossen, da durch Extravasation von Fluoreszenzfarbstoff eine Darstellung der zerebralen Gefäße erschwert bzw. unmöglich gemacht wird. Die Kopfhaut wird dann mittels vier Haltefäden nach oben trichterförmig aufgespannt. Danach wird sterile physiologische Kochsalzlösung aufgebracht, um ein Flüssigkeitsresevoir herzustellen, der für die Immersionsmikroskopie erforderlich ist.

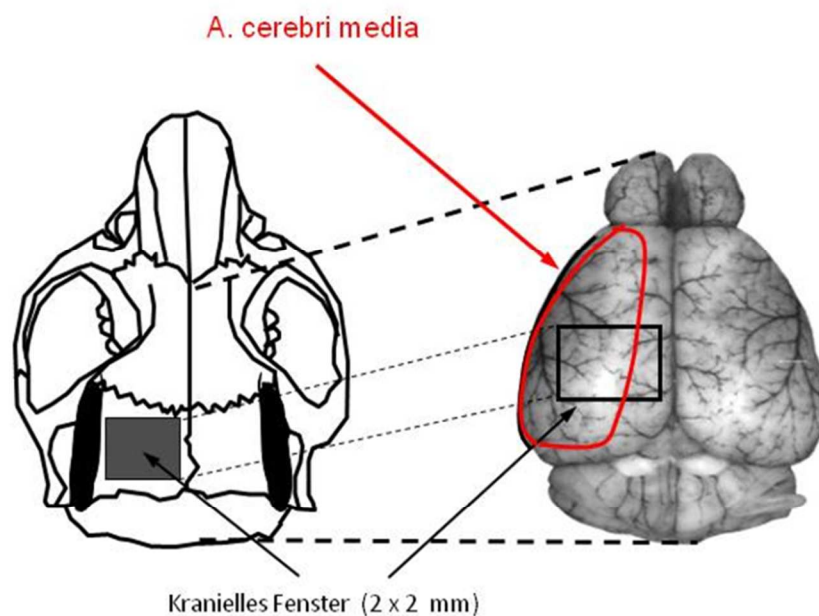


Abbildung 11: Schematische Darstellung eines intrakraniellen Fensters links parietal über dem Stromgebiet der A. cerebri media.

2.2.9.3 Intravitalmikroskopie zerebraler Mikrogefäße

Nach der Positionierung unter dem Mikroskop wird zunächst unter 5x Vergrößerung eine Übersichtsaufnahme durchgeführt. Es folgt die Einteilung der Gefäße nach dem Strahler-Schema. Untersucht werden piale Mikrogefäße (Arteriolen zwischen 9,5 und 65 µm und Venolen). Hiernach werden in höherer Vergrößerung (20x) mehrere Regions of Interest (ROI) identifiziert und aufgezeichnet. Die Positionen werden anhand der Tischkoordinaten und anhand der Anatomie markiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen werden digital aufgezeichnet und für die weitere Auswertung gespeichert. Die Gefäße werden mit der Gabe von 150-200 µl 0,5%ige FITC-Dextran-Lösung (FITC-Dextran gelöst in 0,9%igen NaCl) visualisiert. Im Falle eines Verlustes der Anfärbeintensität des Farbstoffes während der IVM, wird 1/3 des initialen FITC-Dextran-Lösungsvolumen hinzugefügt.

2.2.10 Inhalation

2.2.10.1 Stickstoffmonoxid-Inhalation (iNO)

Stickstoffmonoxid (268 mg/m³ in Stickstoff) wird mit Atemgas (30% O₂ und 70% Stickstoff) gemischt, so dass das Versuchstier mit einer Endkonzentration von 50 ppm beatmet werden kann. Die NO-Konzentration wird vor Beatmung des Versuchstieres mit einem elektrochemischen Gasmonitor (Multi Gas Monitor zur NO-Messung, Industrial Scientific Corporation, Dortmund, D) geprüft.

2.2.10.2 Kohlendioxid-Inhalation

Kohlenstoffdioxid (10% in Stickstoff) wird mit Atemgas (30% O₂ und 70% Stickstoff) gemischt, so dass das Versuchstier mit einer 7,5%igen Kohlenstoffdioxid-Endkonzentration beatmet werden kann. Die CO₂-Konzentration im Atemgas wird mit Hilfe eines Sauerstoffgehaltmessers (Oxidig, Drägerwerk AG Lübeck, Lübeck, D) kontinuierlich verfolgt.

2.2.11 Anwendung von Clazosentan

Clazosentan, (Ro 61-1790 / AXV-034343A / VML 588; Chemischer Name: [5-Methyl-Pyridin-2-Sulfonsäure 6- (2-Hydroxy-Ethoxy) -5- (2-Methoxy-Phenoxy)-2-(2-1H-

Tetrazol-5-yl-Pyridin-4-yl)Pyrimidin-4-ylamid Dinatrium-Salz]; Molekulargewicht: 621,53 g/mol; Molekulare Formel: $C_{25}H_{21}N_9Na_2O_6S$), ist ein gelb-weißes Pulver. Es wird trocken gelagert und verdünnte Lösungen sollen vor Licht geschützt werden. Es ist leicht wasserlöslich bis zu 4,8 mg/100 ml beim pH = 5,9 und 25 g/100 ml bei einem pH-Wert über 7. Es ist eine schwache Disäure mit pKa-Werten von 3,3 und 4,5. Die aktive Dosierung liegt in vitro bei 10^{-10} - 10^{-6} M und in vivo bei 3-10 mg/kg i.v. als Bolus oder 3-10 mg/kg/h i.v. als Infusion. Es hat eine Plasma-Halbwertszeit von weniger als eine Stunde in Ratten und Hunden. Clazosentan hat einen teratogenen Einfluss in höheren Dosen und sollte nicht von schwangeren Frauen eingenommen werden. Abbildung 12 stellt die Strukturformel von Clazosentans da.³⁷³

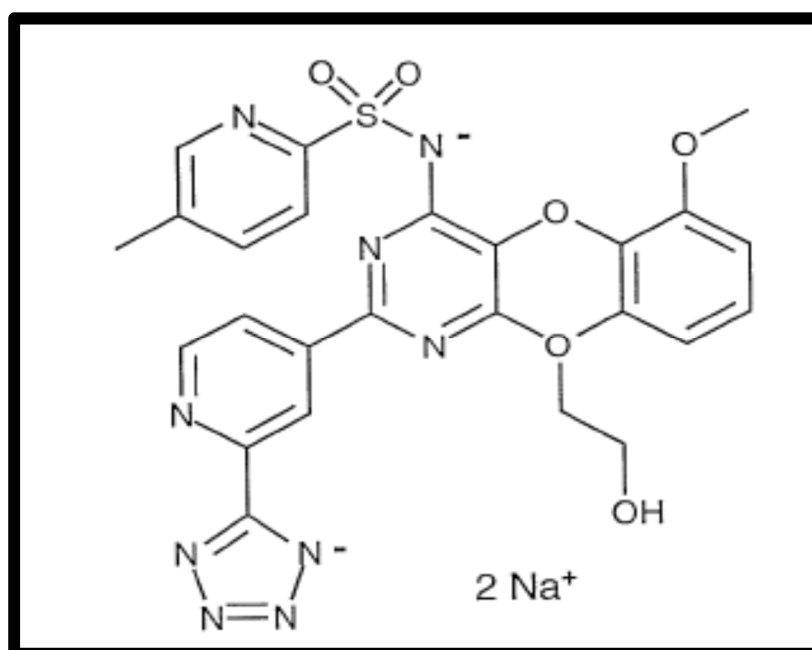


Abbildung 12: Chemische Struktur von Clazosentan

Clazosentan ist ein selektiver Endothelin-A (ETA) Rezeptorantagonist, der zu einer Klasse von trifunktionellen Heteroarylsulfonamido Pyrimidinen gehört.³⁷³⁻³⁷⁵ Es wurde durch Weiterentwicklung von Bosentans, dem ersten in klinischen Studien verwendeten nichtpeptid ET-Rezeptor-Antagonisten,³⁷⁶ bindungsaffiner und wasserlöslicher gemacht.³⁷³ Clazosentan fehlt jegliche Agonisten-Aktivität und ist 1000-fach selektiver für die Hemmung des ET_A - als für ET_B -vermittelte Kontraktion.³⁷³ Aufgrund der hohen Wasserlöslichkeit von Clazosentans eignet es sich besonders gut zur parenteralen Anwendung.³⁷⁵ Studien zeigen, dass Clazosentan Vasospasmen in

großen zerebralen Gefäßen, nach experimenteller und klinischer Subarachnoidalblutung, umkehrt.^{373,377} Die Versuchsmäuse werden randomisiert und einer Behandlung mit Clazosentan oder Vehikel (0,9%igen NaCl) unterzogen. Die Behandlung erfolgt intravenös.

2.2.12 Versuchsprotokolle

2.2.12.1 Stickstoffmonoxid-Inhalation (iNO)

Bei männlichen C57 bl/6 Mäusen (n = 5 pro Gruppe) wird wie oben beschrieben eine SAB induziert. Drei Stunden nach Subarachnoidalblutung wird die zerebrale Mikrozirkulation mittels IVM untersucht, die Messungen erfolgen im Abstand von 10 Minuten. Nach intravenöser Bolusinjektion von FITC Dextran erfolgt eine Quantifizierung des Gefäßbaums nach dem Strahler-Schema. Dann wird 30 Minuten lang die Gefäßdurchmesser sowie Anzahl und Schwere der Mikrovasospasmen in allen Gefäßabschnitten dokumentiert. Anschließend wird die iNO-Gruppe 40 min lang mit 50 ppm NO zusätzlich zum normalen Atemgas behandelt. Die Zuschaltung des Gases erfolgt randomisiert und die Kontrollgruppe wird weiter mit dem normalen Atemgas (30% O₂, 70% Stickstoff) beatmet. Alle 10 Minuten wird die zerebrale Mikrozirkulation erneut quantifiziert. 30 Minuten nach Beendigung der NO-Inhalation erfolgt die letzte Messung. Eine schematische Darstellung des Versuchsablaufs gibt Abbildung 13. Während des gesamten Versuchs wird kontinuierlich der mittlere arterielle Blutdruck aufgezeichnet. Am Ende des Versuchs wurde allen Versuchstieren 150 µl Blut zur Blut-Gas-Analyse entnommen.

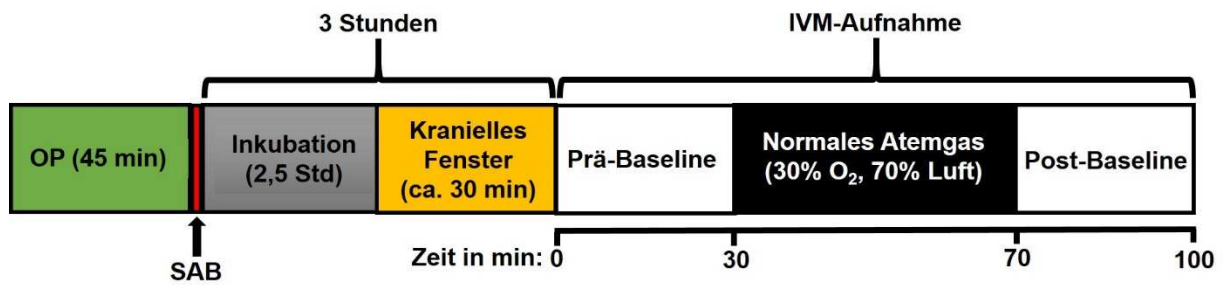
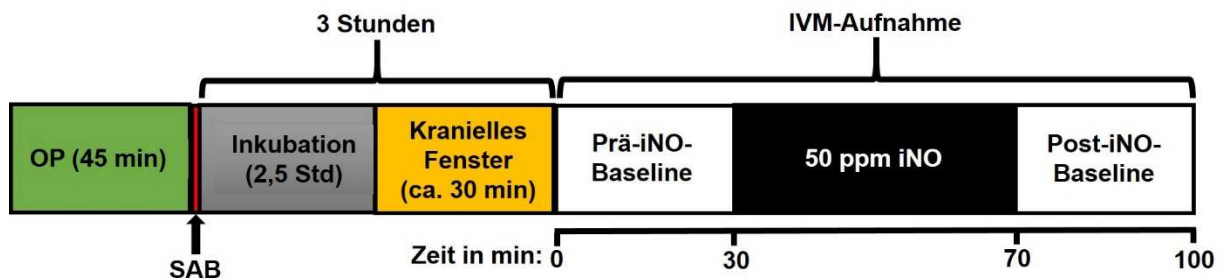
a. Kontrollgruppe**b. iNO-Gruppe**

Abbildung 13: Versuchsprotokoll für die NO-Inhalation-Versuchsreihe. (a) Kontrollgruppe und (b) iNO-Gruppe.

2.2.12.2 Hemmung von Endothelin-1-Rezeptoren mit Clazosentan

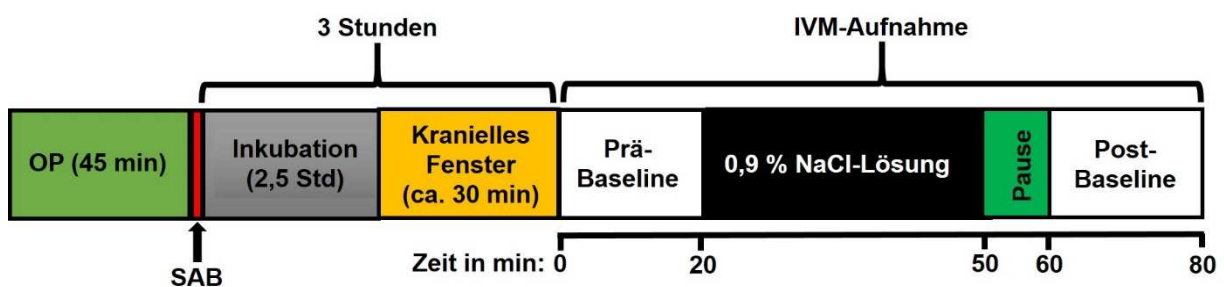
2.2.12.2.1 Dosisfindung von Clazosentan

Da Clazosentan in der Literatur bisher nur bei Ratten³⁷⁸⁻³⁸⁰ verwendet wurde, wurde in einer ersten Versuchsreihe im Rahmen einer Dosisfindung die wirksame Clazosentan-Dosis ermittelt. Hierfür wird der Effekt von unterschiedlichen Clazosentan-Konzentrationen (1 mg/kg KG/h, 3 mg/kg KG/h, 10 mg/kg KG/h, 20 mg/kg KG/h) auf den systemischen Blutdruck und die zerebrale Durchblutung unter physiologischen Bedingungen untersucht. Dafür wird gesunden C57 bl/6 Mäusen (n = 3 pro Gruppe) nach Aufzeichnung einer zehn-minütigen Baseline-Messung die jeweilige Dosis Clazosentan als i.v.-Dauerinfusion über 180 Minuten verabreicht. MAP und CBF werden kontinuierlich über 180 Minuten aufgezeichnet. Als Dosis für die weiteren Versuche wird die höchste Clazosentan-Dosis, die keinen Einfluss auf die gemessenen Parameter zeigt, gewählt.

2.2.12.2.2 Gabe von Clazosentan nach SAB

Drei Stunden nach Induktion der SAB wird bei männlichen C57 bl/6 Mäusen ($n = 6$ pro Gruppe) mittels IVM die zerebrale Mikrozirkulation untersucht. Nach Aufzeichnung der Baseline (zwei Messungen im Abstand von 10 Minuten) beginnt die intravenöse Clazosentan-Gabe (10 mg/kg KG/h bzw. 0,01 ml/min) über 30 Minuten. Die Kontrolltiere erhalten Vehikelsubstanz in gleicher Menge. Alle 10 Minuten erfolgt eine IVM-Messung wie oben beschrieben. Nach Ende der Infusion werden noch zwei weitere IVM-Messungen durchgeführt (siehe Abbildung 14 für eine schematische Übersicht). Zusätzlich wird während der gesamten Versuchsdauer der mittlere arterielle Blutdruck aufgezeichnet. Am Ende des Versuchs wird allen Versuchstieren 150 μ l Blut zur Blut-Gas-Analyse entnommen.

a. Kontrollgruppe



b. Clazo-Gruppe

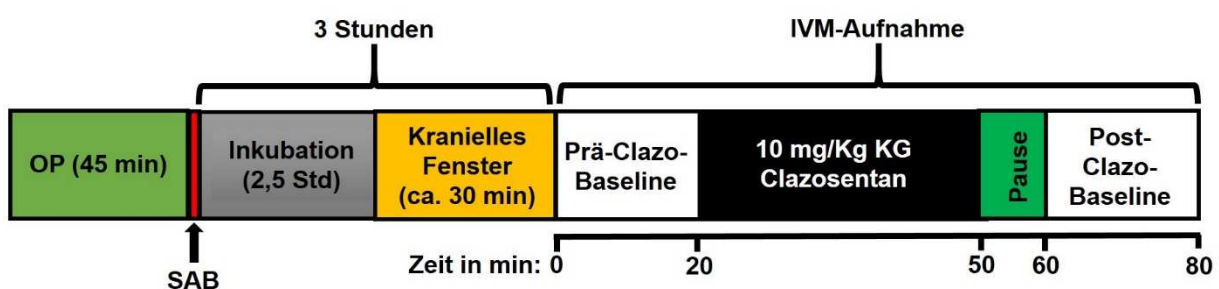
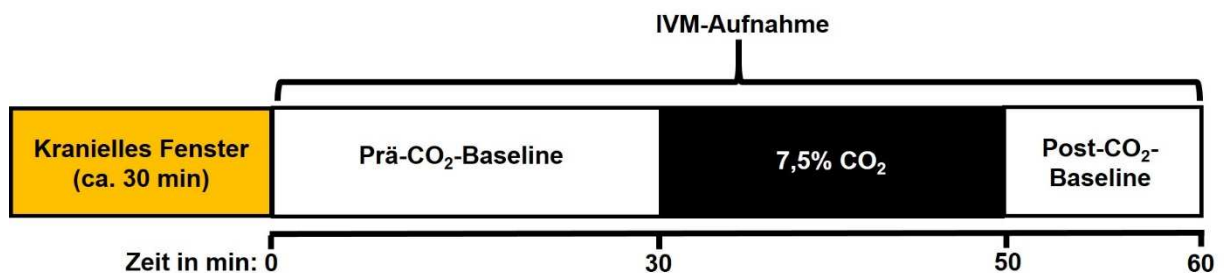


Abbildung 14: Versuchsprotokoll für die Clazosentan-Versuchsreihe während IVM. (a) Kontrollgruppe und (b) Clazo-Gruppe.

2.2.12.3 Untersuchung der Rolle der NOS-Isoformen bei Vermittlung der CO₂-Reaktivität zerebraler Gefäße

Männliche C57 bl/6 Mäuse (n = 15), eNOS^{-/-} (n = 8), nNOS^{-/-} (n = 8), iNOS^{-/-} (n = 8), werden narkotisiert und für die Intravitalmikroskopie vorbereitet. MAP und CBF werden nach Messung einer Baseline kontinuierlich aufgezeichnet. Alle 10 min wird die zerebrale Mikrozirkulation wie oben beschrieben aufgezeichnet. Vor jeder IVM-Phase wird erneut ein Bolus FITC-Dextran i.v. appliziert. Die Untersuchung der CO₂-Inhalationsphase beginnt ab der 30. Minute 20 Minuten lang. 10 Minuten später erfolgt eine abschließende Messung. Eine schematische Darstellung des Versuchsablaufs gibt Abbildung 15. Am Ende des Versuchs wird allen Versuchstieren 150 µl Blut zur Blut-Gas-Analyse entnommen.

a. Kontrollgruppe



b. iNOS^{-/-}, nNOS^{-/-}, eNOS^{-/-}-Gruppe

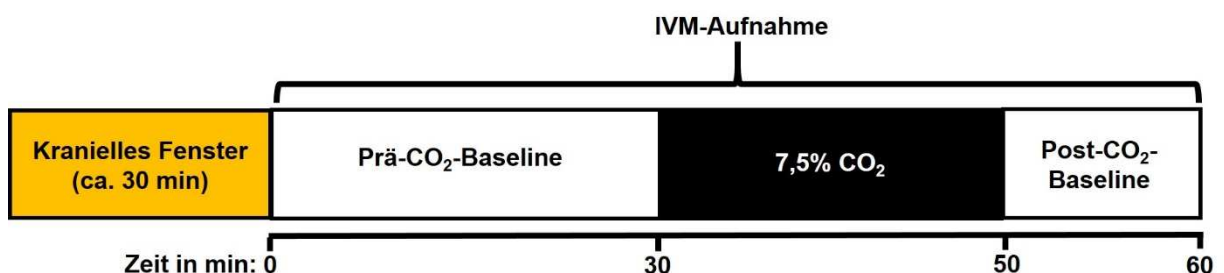


Abbildung 15: Versuchsprotokoll für die CO₂-Inhalations-Versuchsreihe während IVM. (a) Kontrollgruppe und (b) iNOS^{-/-}, nNOS^{-/-}, eNOS^{-/-}-Gruppe.

3. Ergebnisse

3.1 Effekt von inhaliertem NO (iNO) auf die zerebrale Mikrozirkulation nach experimenteller Subarachnoidalblutung

3.1.1 Induktion der SAB

Vor SAB wiesen die Mäuse einen normalen intrakraniellen Druck zwischen 3 und 7 mmHg auf. Nach Induktion der Blutung stieg der ICP abrupt auf Werte von $92,3 \pm 8,3$ mmHg an. Während der nächsten Minuten sank der ICP-Wert und blieb jedoch zum Zeitpunkt 15 Minuten ($27,3 \pm 3,5$ mmHg) signifikant erhöht (Abbildung 16 a). Gleichzeitig zeigte sich eine drastische Reduktion der regionalen zerebralen Durchblutung auf $16,8\% \pm 4,2\%$ des Ausgangswertes, die sich ebenfalls während der nächsten Minuten langsam zurückbildete. Am Ende der Beobachtungszeit, 15 Minuten nach SAB, erholte sich die zerebrale Durchblutung auf ca. $79,7\% \pm 10,1\%$ des Ausgangswertes (Abbildung 16 b). Dies entspricht den Werten, die in vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe erhoben wurden.¹²⁷ Aufgrund der geringen Abweichung kann in allen Gruppen von einer vergleichbar starken Blutung ausgegangen werden.

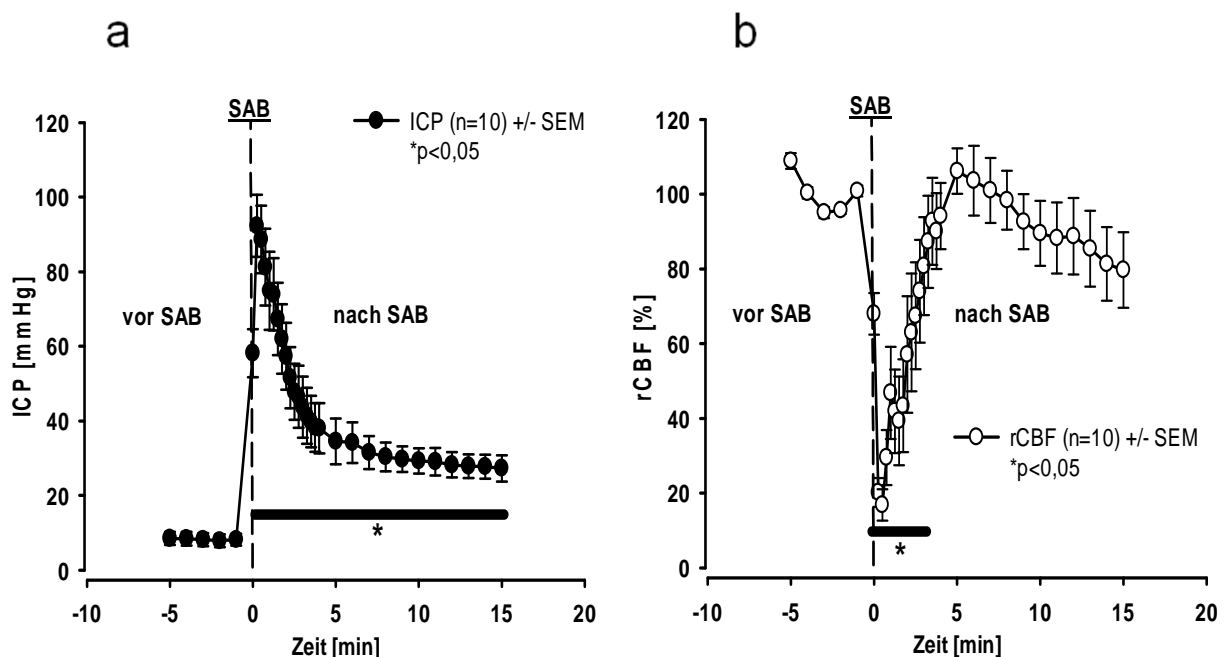


Abbildung 16: (a) Intrazerebraler Druck (ICP) und (b) zerebrale Durchblutung (rCBF), vor, während und nach der SAB Induktion.

3.1.2 Einfluss des inhalierten Stickstoffmonoxids auf die zerebrale Mikrozirkulation nach SAB

3.1.2.1 Systemischer arterieller Blutdruck

Der mittlere arterielle Blutdruck wurde kontinuierlich aufgezeichnet. Die NO-Inhalation hatte keinen signifikanten Einfluß auf den MAP weder im Vergleich zu den Werten vor NO-Gabe (vor iNO: $72,6 \pm 10,5$ mmHg und nach 40 min iNO: $72,0 \pm 7,5$ mmHg) noch im Vergleich zur Kontrollgruppe (30. Min: $74,7 \pm 4,7$ mmHg und 70. Min: $61,6 \pm 3,09$ mmHg) (Abbildung 17).

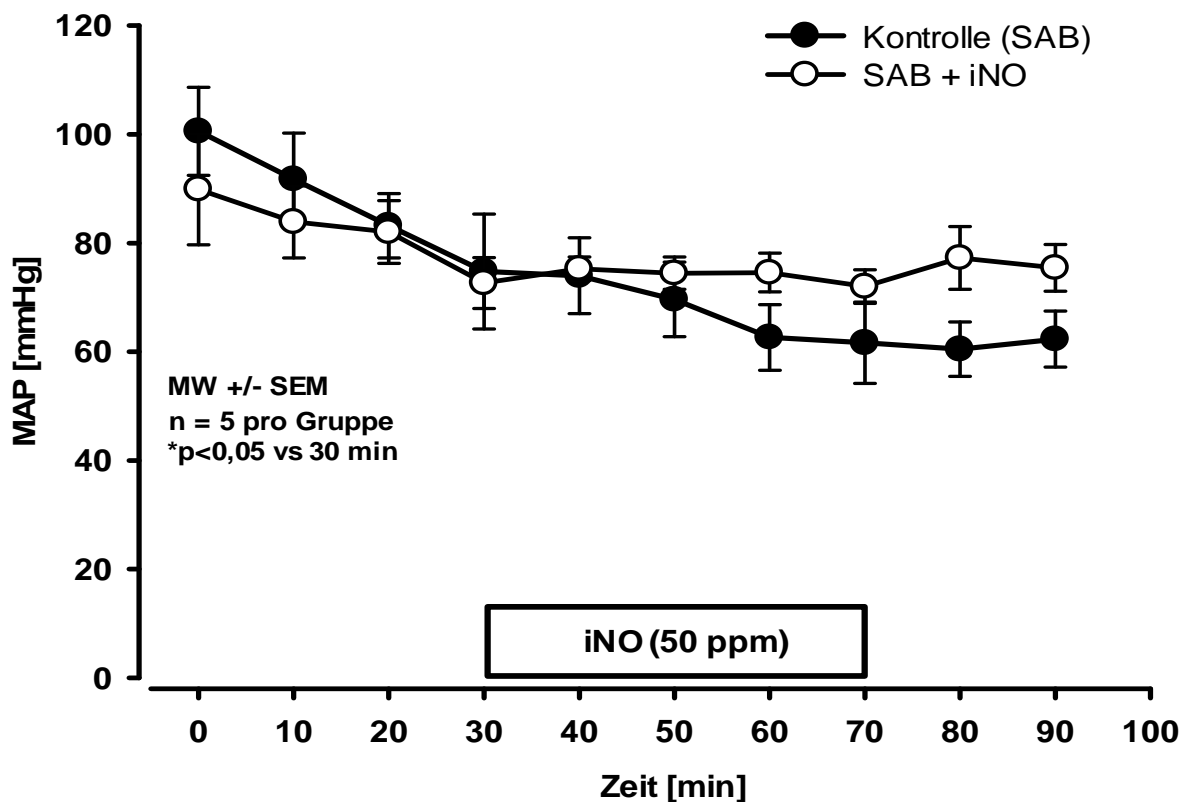


Abbildung 17: Die Stickstoffmonoxid-Inhalation hat keinen Einfluss auf den systemischen Blutdruck (gemessen in der A. femoralis).

3.1.2.2 Physiologische Parameter

Während des gesamten Versuchs wurde der arterielle $p\text{CO}_2$ durch entsprechende Anpassung der Beatmungsparameter im physiologischen Bereich gehalten. Am Ende des Versuchs zeigte sich in Bezug auf $p\text{O}_2$, $p\text{CO}_2$ kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (Tabelle 14).

Tabelle 14: Tabellarische Darstellungen des $p\text{CO}_2$ und $p\text{O}_2$ nach 100 min Versuch.

Gruppe	$p\text{CO}_2$	$p\text{O}_2$
SAB	$37,63 \pm 2,33$	$102,6 \pm 18,0$
SAB + iNO	$39,2 \pm 2,46$	$93,7 \pm 3,67$

MW \pm SEM [SAB (n = 5); SAB + iNO (n = 5)]

3.1.3 Einfluss von NO auf die arteriellen Gefäßdurchmesser

Direkt nach Beginn der NO-Inhalation (ab der 30. min) kam es in den kleinen und kleinsten Arteriolen (Gefäßdurchmesser 9,5 bis 25 μm) zu einer signifikanten Dilatation (Abbildung 18 b und c, in Kategorie 1: nach 30 min iNO: $126\% \pm 3,03\%$, nach 40 min iNO: $126\% \pm 4,11\%$ und 30 min nach iNO-Stopp: $134\% \pm 5,3\%$. In Kategorie 2 nach 40 min iNO: $117\% \pm 1,52\%$ und 30 min nach iNO-Stopp: $122\% \pm 1,45\%$; $p < 0,05$). Dieser gefäßerweiternde Effekt blieb auch nach Beendigung der NO-Inhalation erhalten und war bis zum Ende des Untersuchungszeitraums nachweisbar. In Kapillaren (Durchmesser 5,0-9,0 μm , Kategorie 0, Abbildung 18 a) zeigte sich trendmäßig die gleiche Veränderung. In den größeren Gefäßen (Kategorie 4-5, Abbildung 18 e und f) zeigte sich kein Effekt der NO-Inhalation auf die Gefäßweite.

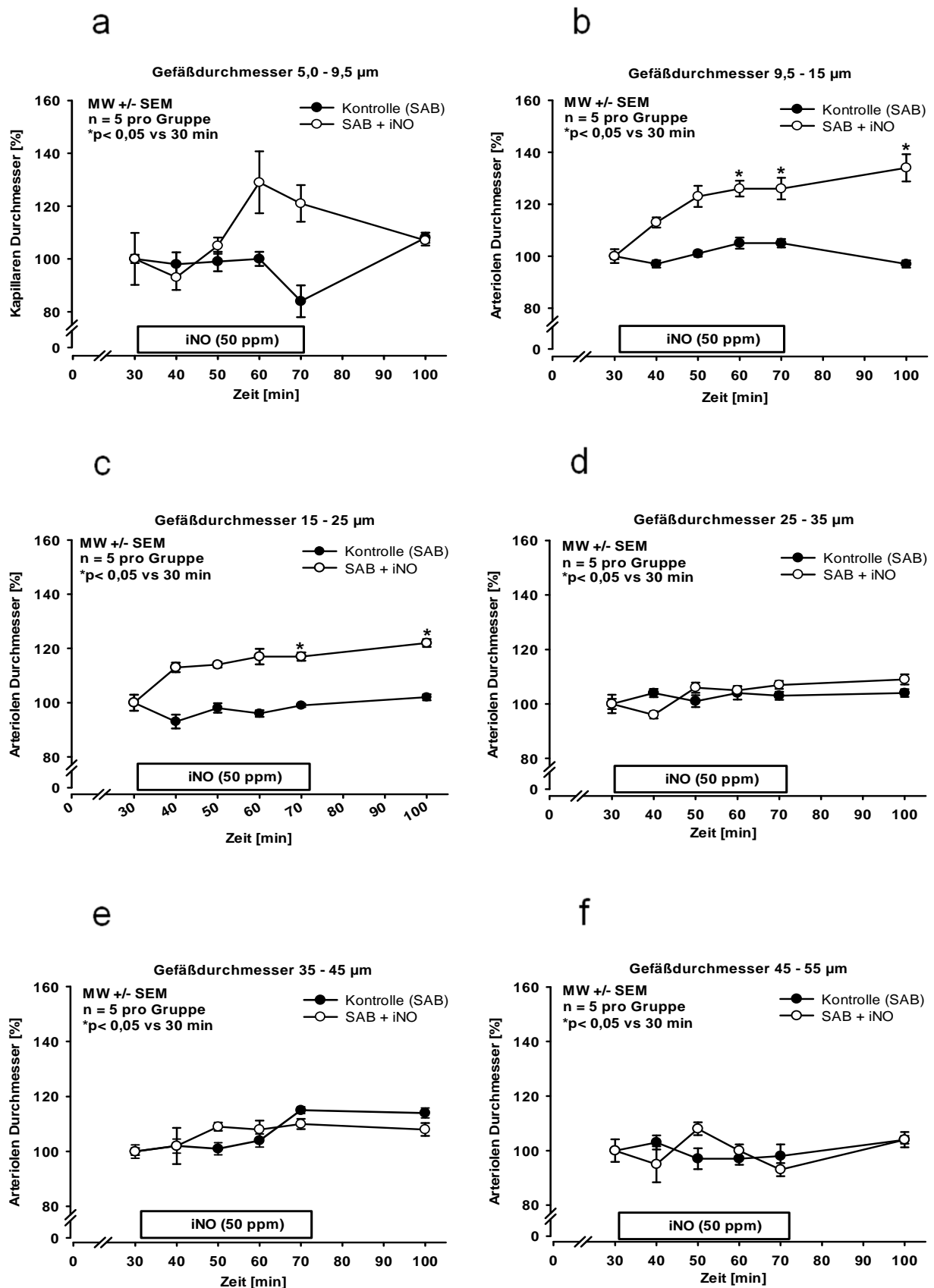


Abbildung 18: Einfluss der NO-Inhalation auf den Durchmesser zerebraler Kapillaren (5,0-9,5 μm) und Arteriolen (9,5-65 μm).

3.1.4 Einfluss der NO-Inhalation auf die zerebralen Mikrovasospasmen

Drei Stunden nach SAB zeigte sich in der zerebralen Mikrozirkulation eine signifikante Anzahl von mikrovaskulären Kontraktionen (siehe Beispielbild in Abbildung 19). Anzahl, Intensität und Verteilung entsprachen den Befunden in vorangegangenen Studien.¹⁸⁴

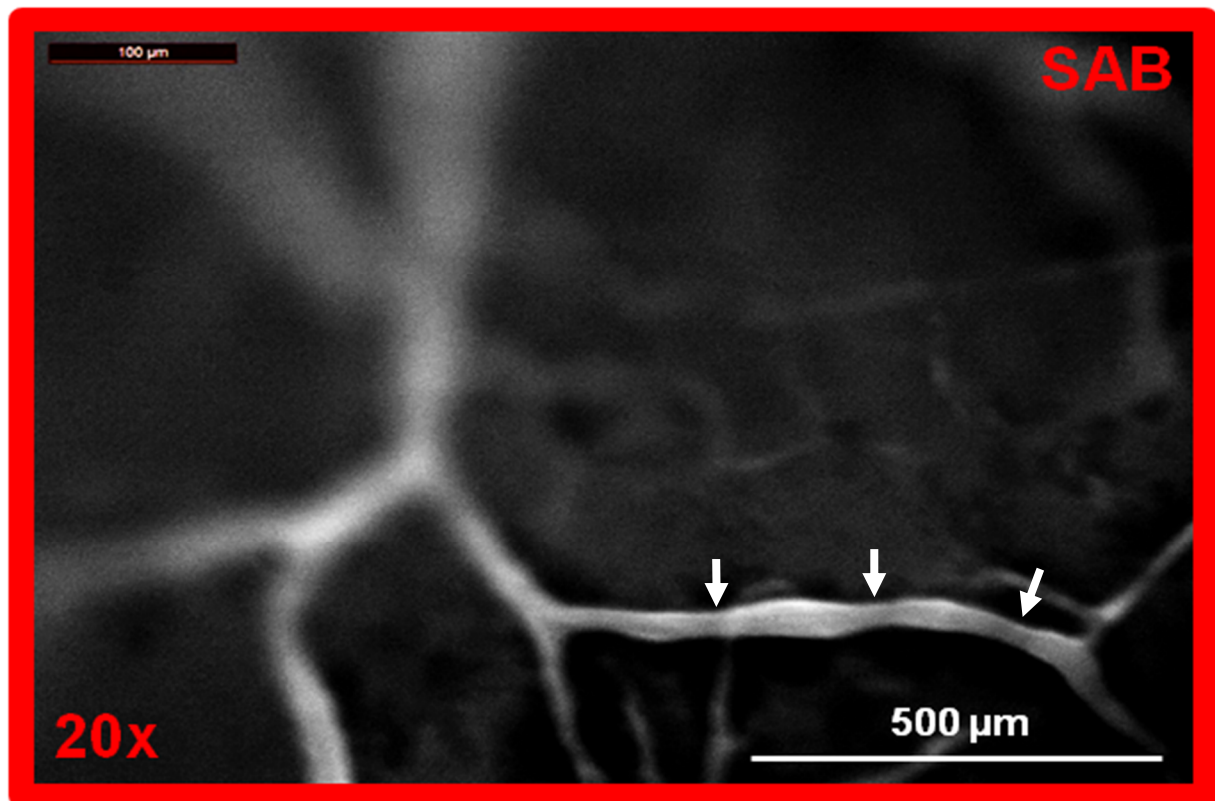


Abbildung 19: Mikrovaskuläre Kontraktionen von Arteriolen der Kategorie 1 und 2 drei Stunden nach SAB.

Vor Beginn der NO-Inhalation zeigte sich in beiden Gruppen eine gleiche durchschnittliche Anzahl an Spasmen pro Gefäßabschnitt. Sofort nach Induktion von iNO kam es zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl der Spasmen. Diese Reduktion hielt auch nach Beendigung von iNO an (Abbildung 20, nach 10 min iNO: 38% weniger MVS, nach 20 min iNO: 67% weniger MVS, nach 30 min iNO: 73% weniger MVS, nach 40 min iNO: 81,5% weniger MVS und 30 min nach iNO-Stopp: 77,4% weniger MVS pro Gefäßabschnitt).

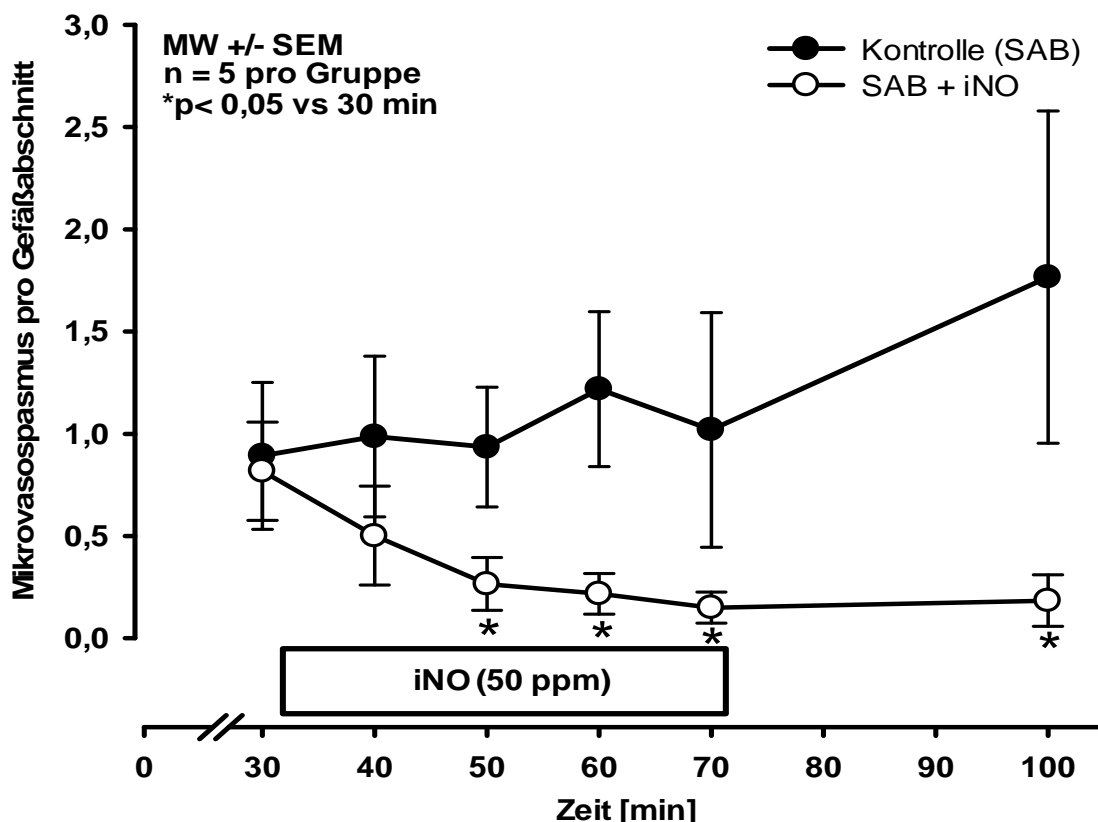


Abbildung 20: Durchschnittliche Anzahl von Mikrovasospasmen pro Gefäßabschnitt mit und ohne NO-Inhalation.

Betrachtet man die Gesamtzahl von Spasmen in allen Gefäßkategorien (Abbildung 21), zeigt sich dieser Effekt noch deutlicher: Bereits kurz nach Beginn von iNO sank die Zahl deutlich ab und reduzierte sich gegen Ende der 40-minütigen Inhalation auf 16% des Ausgangswertes. Diese signifikante Reduktion ist auch 30 Minuten nach Beendigung der NO-Inhalation noch nachweisbar.

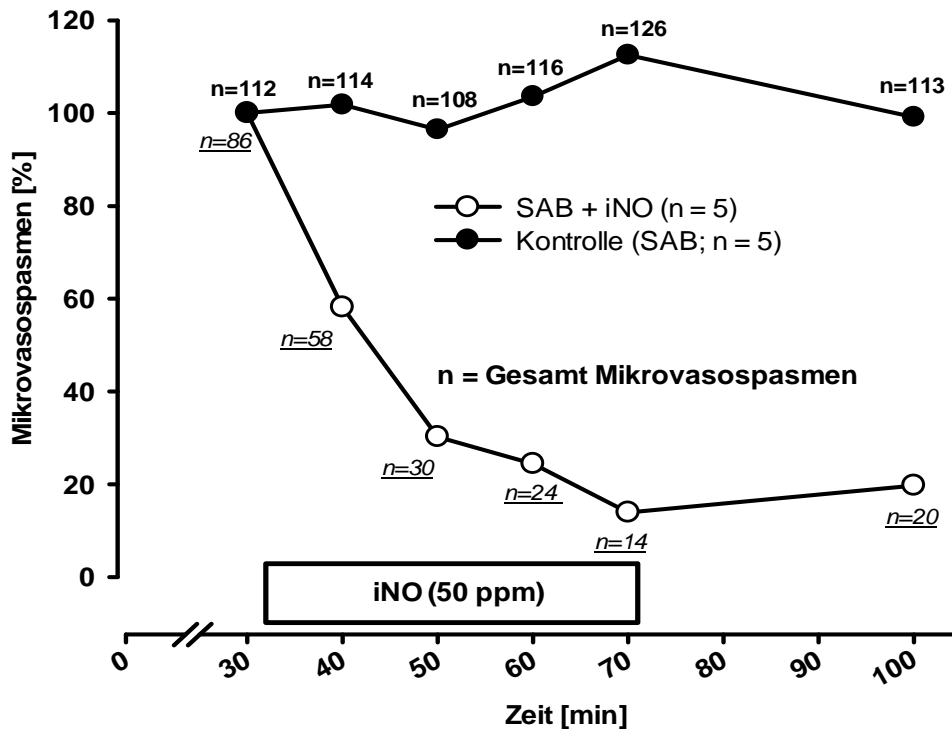


Abbildung 21: Gesamtanzahl von Mikrovasospasmen in allen Gefäßkategorien mit und ohne NO-Inhalation.

3.1.5 Räumliche Verteilung der Mikrovasospasmen

Vasospasmen zeigten sich in der vorliegenden Versuchsserie vor allem in Arteriolen mit einem Kaliber von 9,5 bis 25 μm (Abbildung 22 b und 22 c). Hier zeigte sich wiederum die signifikante Reduktion der Zahl der Spasmen durch die NO-Inhalation (Abbildung 22 b und c, Kategorie 1: nach 10 min iNO: 50% weniger MVS, nach 20 min iNO: 78% weniger MVS, nach 30 min iNO: 77% weniger MVS, nach 40 min iNO: 86,5% weniger MVS und 30 min nach iNO-Stopp: 85,6% weniger MVS. In Kategorie 2 nach 10 min iNO: 41% weniger MVS, 20 min nach iNO: 68,5% weniger MVS, 30 min nach iNO: 73,5% weniger MVS, 40 min nach iNO: 89% weniger MVS und 30 min nach iNO-Stopp: 67% weniger MVS; $p < 0,05$). In Gefäßen höherer Kategorie (Durchmesser 25-45 μm , Abbildung 22 d, e) zeigten sich sehr wenige bis keine Spasmen, auch hier hat iNO keinen signifikanten Effekt.

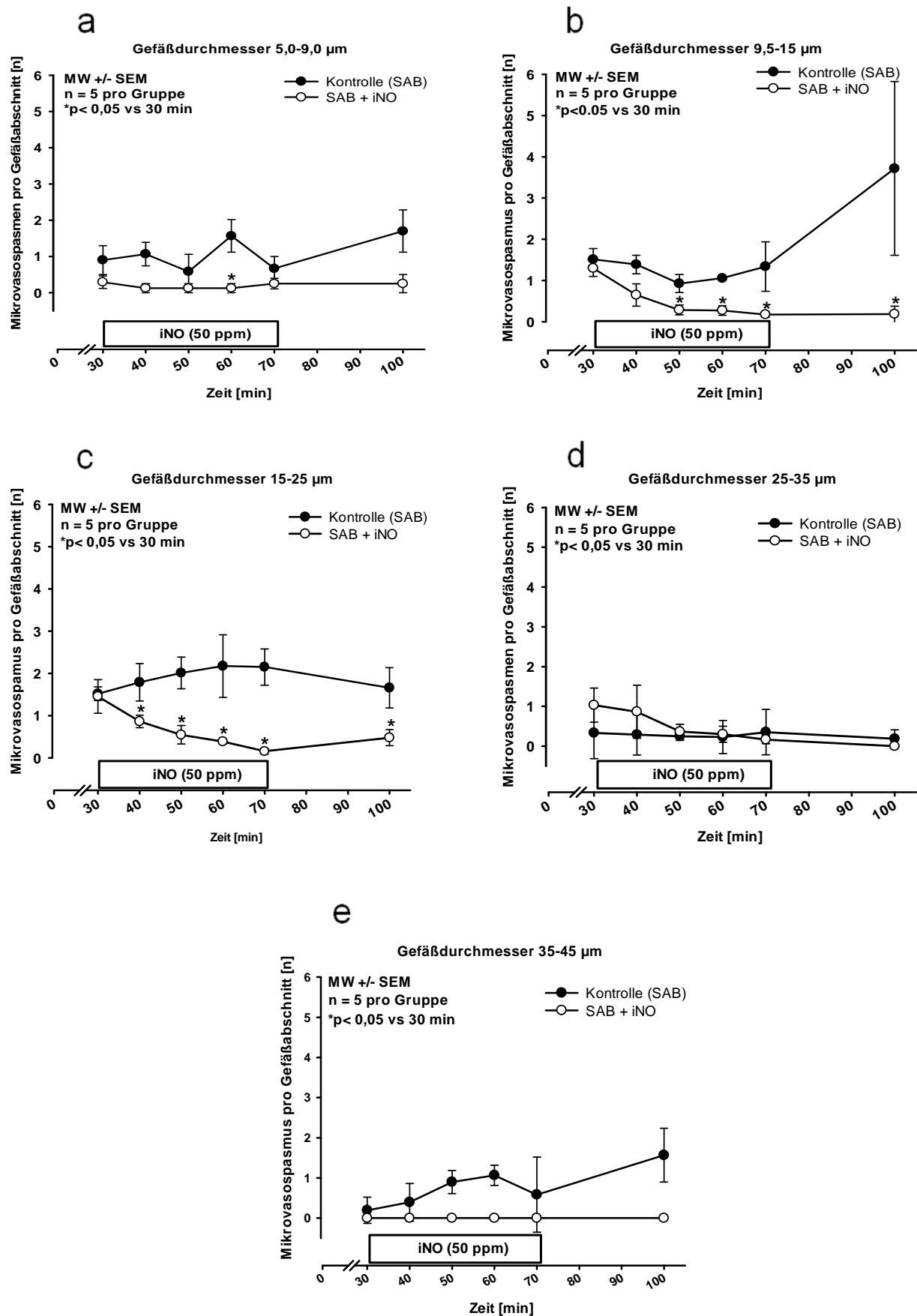


Abbildung 22: Räumliche Verteilung der Mikrovasospasmen (pro Gefäßabschnitt).

3.1.6 Effekt der NO-Inhalation auf den Grad der Mikrovasospasmen

Die überwiegende Mehrzahl der Spasmen ist leicht- bis mittelgradig, d. h. die Gefäße wiesen einen Konstriktionsgrad zwischen 10 und 40% der Baseline auf. Höhergradige Konstriktionen waren selten (Abbildung 23 a). Die NO-Inhalation führt zu einer raschen Erweiterung der verengten Arteriolen, insbesondere der am häufigsten auftretenden Spasmen mit einem Konstriktionsgrad zwischen 10-20% (Abbildung 23 c: $p = 0,032$, d: $p = 0,016$ und Abbildung 23 e: $p = 0,008$). Auch hier lässt sich 30 Minuten nach Ende der Therapie weiterhin ein signifikanter Effekt nachweisen (Abbildung 23 f).

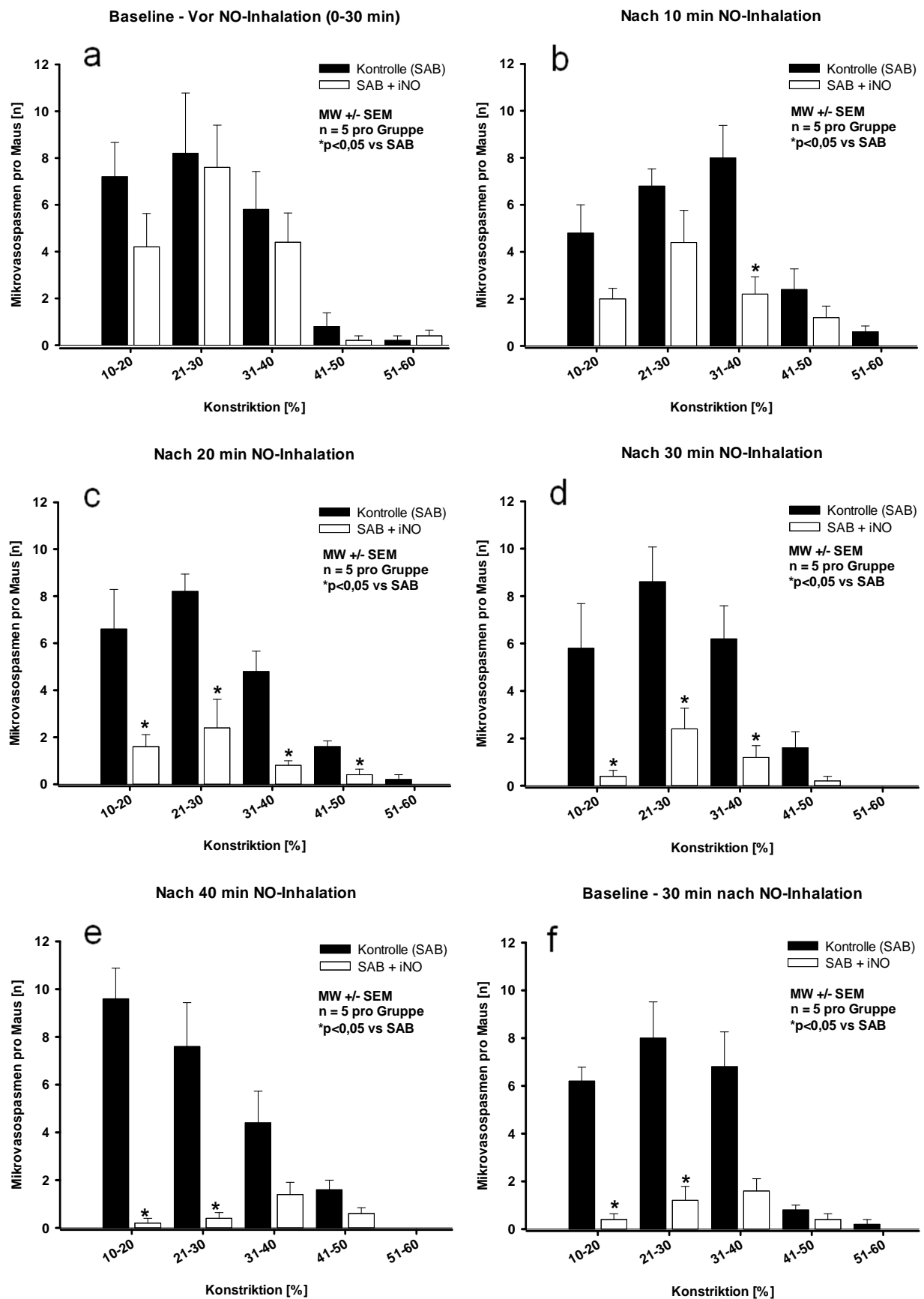


Abbildung 23: Effekt der NO-Inhalation auf dem Mikrovasospasmus im Hinblick auf den Konstriktionsgrad. Die NO-Inhalation vermindert bzw. verhindert v. a. leicht- bis mittelgradige Spasmen (10-30%), die jedoch die Mehrzahl aller Spasmen ausmachen.

3.1.7 Einfluss der NO-Inhalation auf Durchmesser zerebraler Venolen

Zerebrale Venolen zeigten unter der NO-Inhalation keine Änderung ihres Durchmessers (Abbildung 24).

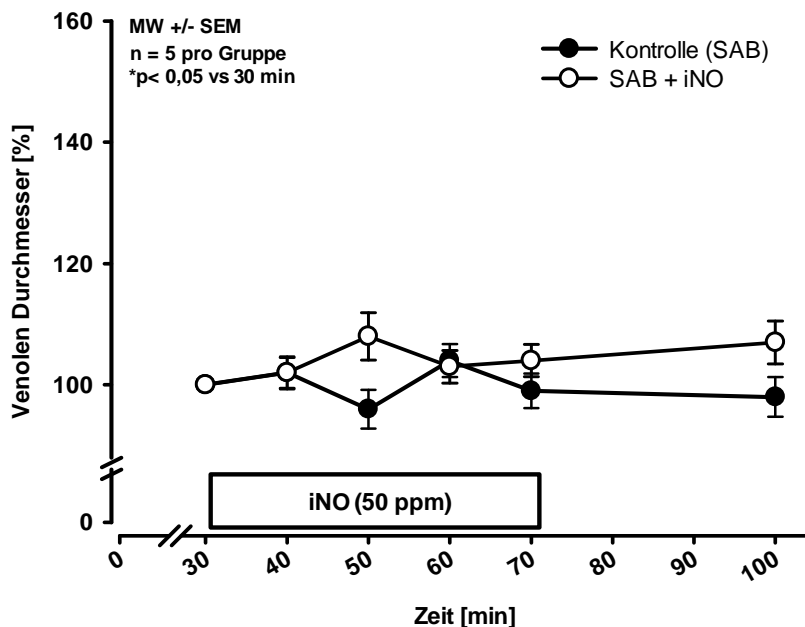


Abbildung 24: Kein Einfluss von iNO auf den Durchmesser von zerebralen Venolen.

3.2 Effekt der Endothelin-Rezeptor-Blockade auf die zerebrale Mikrozirkulation nach experimenteller Subarachnoidalblutung

3.2.1 Dosisfindung Clazosentan

Da bisher keine Untersuchungen zur Verwendung des ET-1-Rezeptor-Antagonisten Clazosentan in der Maus vorlagen, führten wir zunächst eine Vorstudie mit unterschiedlichen Dosierungen des Medikaments durch. Zum Ausschluss signifikanter Nebenwirkungen auf zerebrale Durchblutung und den systemischen Blutdruck wurde Clazosentan in den Dosen 1, 3, 10 und 20 mg/kg KG/h über 180 Minuten kontinuierlich intravenös über einen V. femoralis-Katheter appliziert. Abbildung 25 zeigt die graphische Darstellung von MAP (a) und CBF (b). Im beobachteten Zeitraum kam es zu keinen signifikanten Veränderungen von MAP oder CBF. Die Gruppe mit der höchsten Dosierung zeigte jedoch über die Zeit einen tendenziellen MAP-Abfall. Als Dosis für die weiteren Versuche wurde deswegen die nächstgeringere Dosis, welche keinen MAP-Effekt hatte, eingesetzt: 10 mg/kg KG/h.

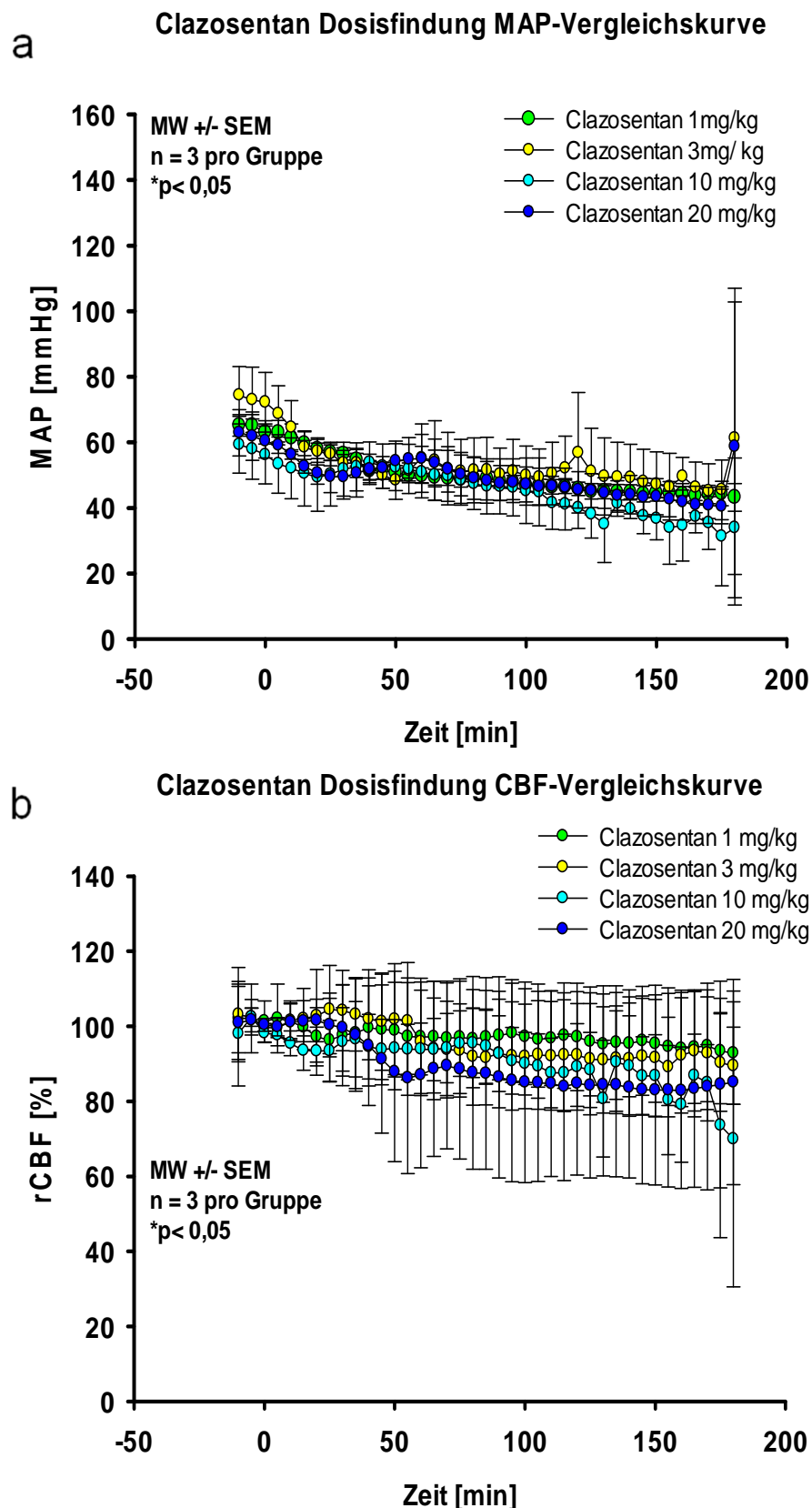


Abbildung 25: Clazosentan-Dosisfindung: Effekt unterschiedlicher Dosen von Clazosentan auf den systemischen arteriellen Blutdruck (MAP, a) und die regionale zerebrale Durchblutung (rCBF, b). Die untersuchten Dosierungen 1 mg/Kg, 3 mg/Kg, 10 mg/Kg und 20 mg/Kg hatten keinen signifikanten Effekt auf die untersuchten Parameter.

3.2.2 Einfluss der ET1-Rezeptor-Blockade auf die zerebrale Mikrozirkulation

3.2.2.1 MAP

Der systemische Blutdruck fiel mit der Zeit in beiden Gruppen tendenziell ab. Zwischen der Kontroll- und der Clazosentan-Gruppe zeigte sich jedoch kein Unterschied (Abbildung 26).

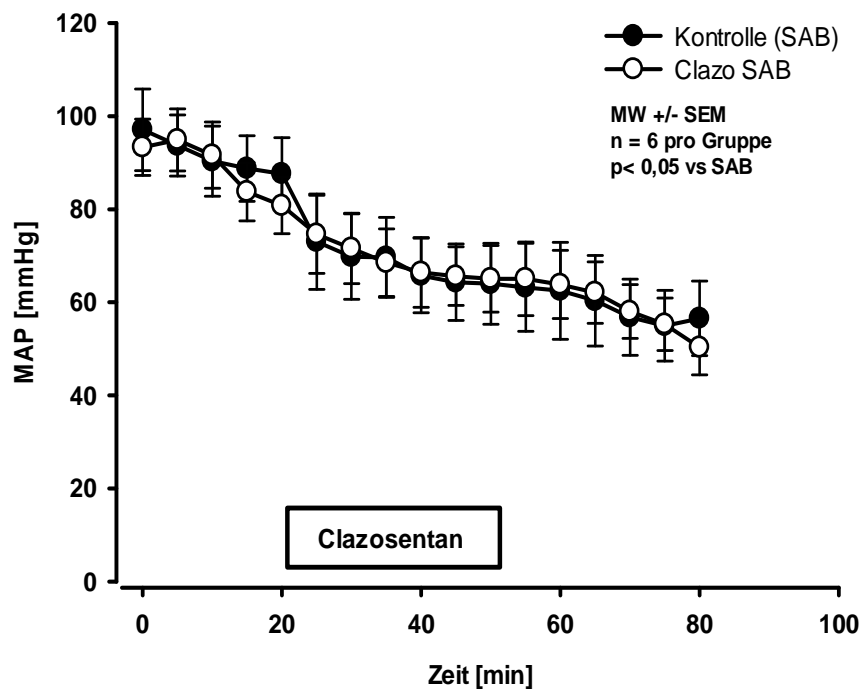


Abbildung 26: MAP während der IVM mit und ohne Clazosentan-Gabe. Unter Infusion von 10 mg/kg KG/h zeigte sich der MAP im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert.

3.2.2.2 Blut-Gas-Analyse

Die physiologischen Parameter am Ende des Untersuchungszeitraums waren in beiden Gruppen vergleichbar (Tabelle 15).

Tabelle 15: Tabellarische Darstellungen des pCO₂ und pO₂ nach 80 min Versuch.

Gruppe	pCO ₂	pO ₂
SAB	37,0 ± 0,08	76,3 ± 3,87
Clazo SAB	40,6 ± 4,13	81,2 ± 10,5

MW ± SEM [SAB (n = 6); SAB + iNO (n = 6)]

3.2.2.3 Einfluss von 10 mg/kg KG/h Clazosentan auf den Durchmesser von zerebralen Arteriolen (9,5-55 μm)

Unter Clazosentan-Infusion zeigte sich in den Arteriolen von 9,5 bis 35 μm (Abbildung 27 a-c) keine signifikante Vasodilatation, die ET1-Rezeptor-Blockade führte lediglich zu geringen Schwankungen des Gefäßdurchmessers.

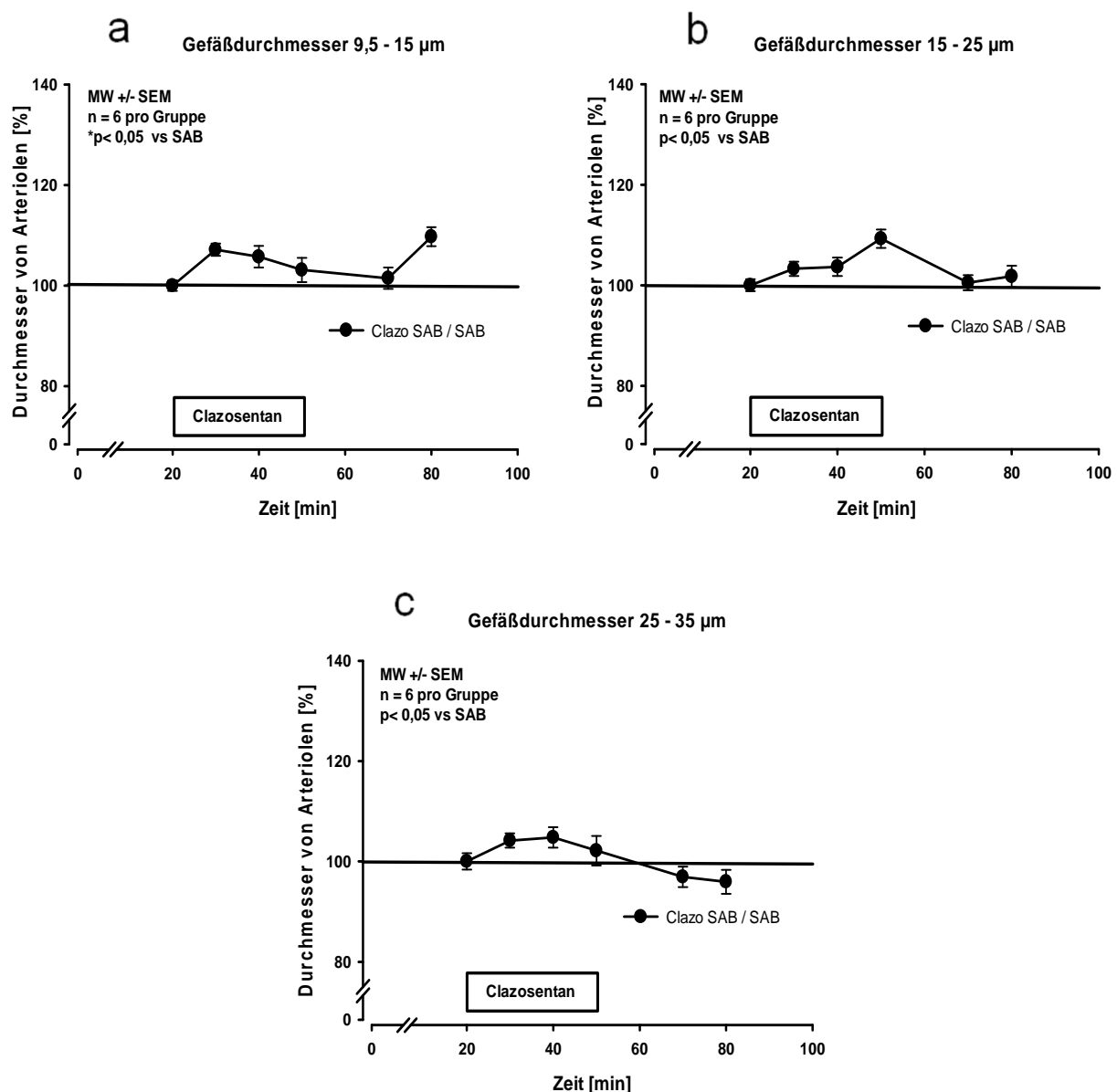


Abbildung 27.: ET-Rezeptorblockade durch Clazosentan führt in kleineren pialen Arteriolen zu keiner signifikanten Vasodilatation. Die Werte der Clazosentan-Gruppe wurden auf die Kontrollgruppe normalisiert (Durchmesser vor Beginn der Infusion entspricht 100%).

Größere Gefäße bzw. Arteriolen mit einem Durchmesser von 35-45 μm reagierten auf 10 mg/kg KG/h Clazosentan mit einer signifikanten Vasodilatation in der 50. Minute ($126,6\% \pm 2,0\%$, $p = 0,015$). Diese ist jedoch rasch reversibel nach Ende der Medikamentengabe (Abbildung 28 a). Arteriolen mit einem Durchmesser von 45-55 μm weisen in der 30. Minute nach Clazosentan-Infusion eine signifikante Erweiterung der Gefäße von $121,01\% \pm 2,2\%$ bei $p = 0,03$. Anschließend ist eine Verengung der Gefäße zu beobachten (Abbildung 28 b).

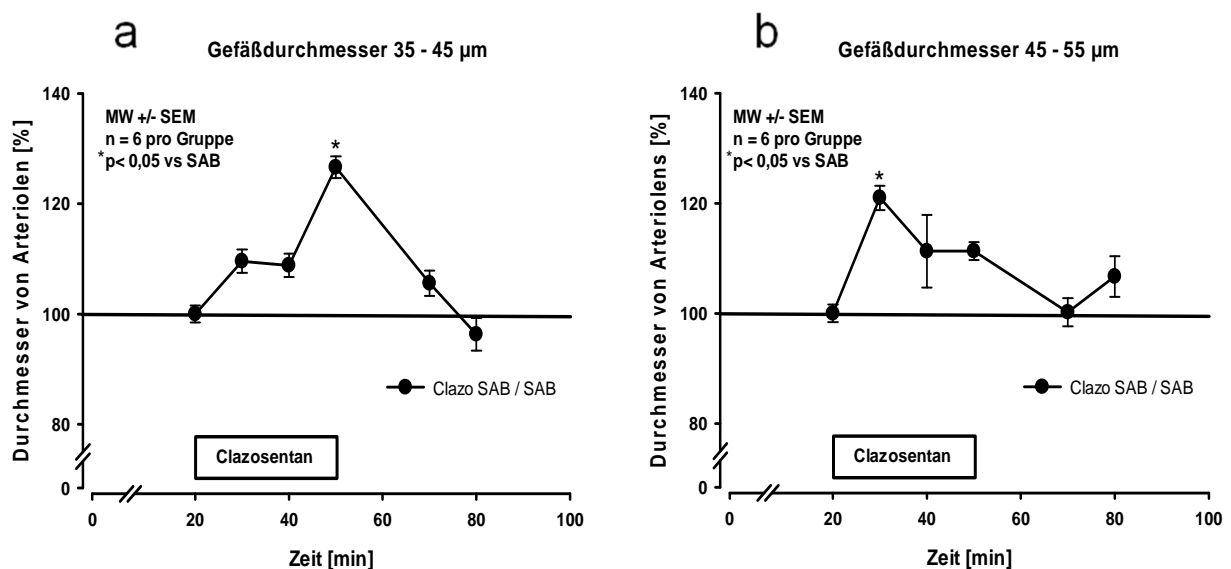


Abbildung 28: ET-1-Rezeptorblockade mit Clazosentan (10 mg/kg KG/h) auf größere zerebrale Arteriolen. Unter Clazosentan-Infusion kommt es zu einer kurzfristigen signifikanten Vasodilatation bei Arteriolen mit einem Durchmesser von 35-45 μm (a) und 45-55 μm (b).

3.2.2.4 Effekt der ET1-Rezeptorblockade auf die posthämorrhagischen Mikrovasospasmen

Die Clazosentan-Infusion führte ab der 20. Min zur einen tendenziellen Verringerung von Vasospasmenzahl bis zur 70. Min in Arteriolen der Kategorie 1 (Abbildung 29 a). Arteriolen der Kategorie 2 (Abbildung 29 b) zeigten eine signifikante Verringerung der MVS-Zahl gegenüber der Kontrolle in der 50. Min (die MVS-Zahl verringerte sich um $50\% \pm 3,5\%$, $p = 0,041$). In der Kategorie 3 (Abbildung 29 c) sind signifikante Verringerungen bzgl. der MVZ-Zahl in der 50. Min (MVS-Zahl verringerte sich um 30%

$\pm 8,0\%$, $p = 0,008$), 70. Min (MVS-Zahl verringerte sich um $75\% \pm 0\%$, $p = 0,015$) und 80. Min (MVS-Zahl verringerte sich um $46,05\% \pm 0\%$, $p = 0,015$) zu verifizieren.

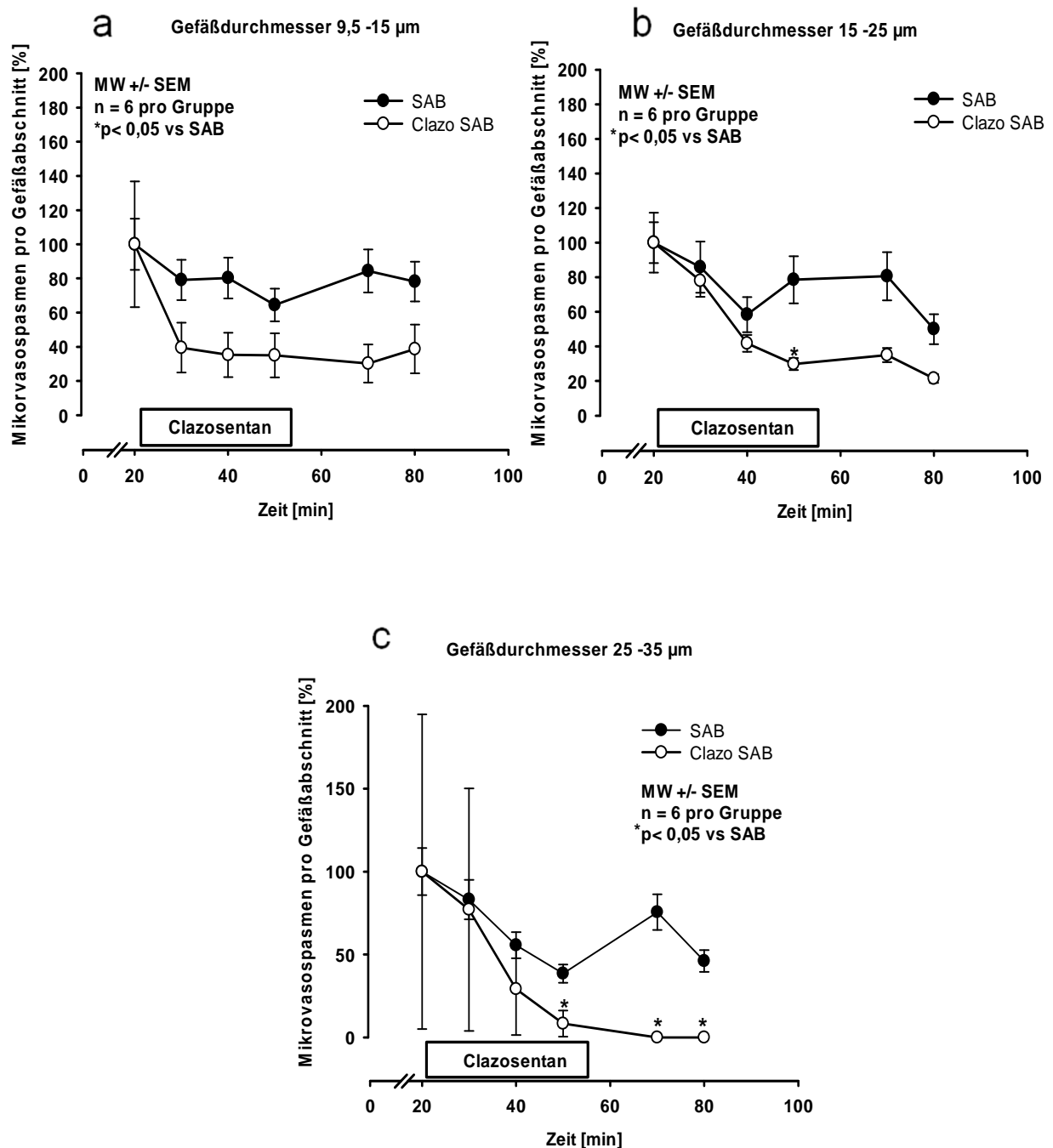


Abbildung 29: Effekt der ET1-Rezeptorblockade auf die Anzahl an Mikrovasospasmen. Unter Clazosentan-Infusion kommt es zu einer signifikanten Mikrovasospasmenzahl Reduzierung bei Arteriolen mit einem Durchmesser von 15-25 μm (b) und 25-35 μm (c).

3.2.2.5 Effekt der ET1-Rezeptorblockade auf die Anzahl und den Konstriktionsgrad der Mikrovasospasmen

Die überwiegende Mehrzahl der Spasmen ist mittelgradig ausgeprägt. Die Gefäße wiesen vor allem MVS mit einem Konstriktionsgrad zwischen 10 und 30% der Baseline auf. Höhergradige Konstriktion der Gefäße sind selten (Abbildung 30 a). Die Clazosentan-Infusion (10 mg/kg KG/h) führt zu einer Erweiterung der Spasmen die einen Konstriktionsgrad zwischen 10-30% aufweisen. 30 min nach Therapie bleiben MVS, die einen Konstriktionsgrad zwischen 21-30% aufweisen, signifikant verringert (Abbildung 30 f).

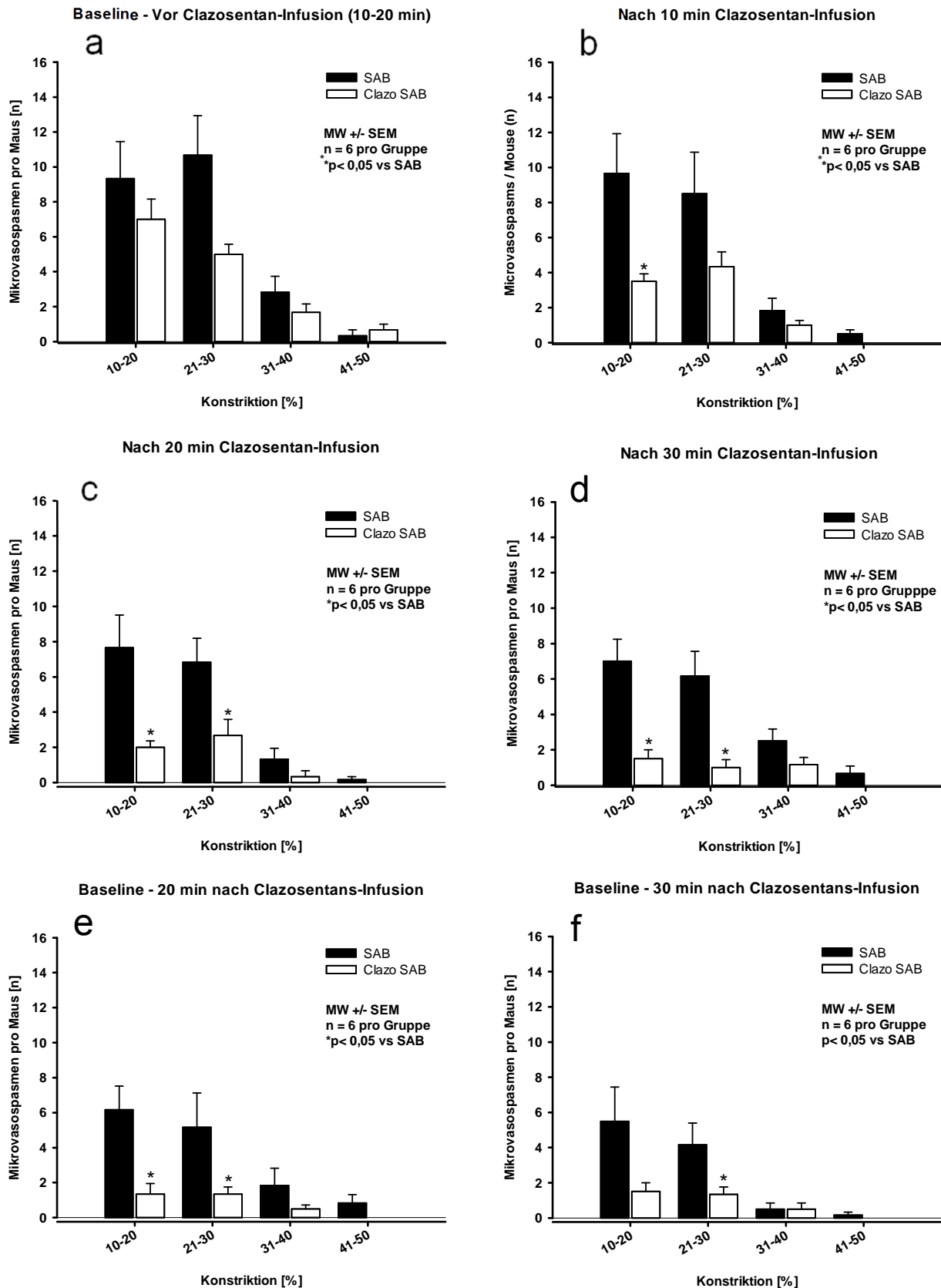


Abbildung 30: Effekt der ET-1-Rezeptorblockade auf die Anzahl und Konstriktionsgrad von Mikrovasospasmen. Die Clazosentan-Infusion vermindert bzw. verhindert v. a. leicht- bis mittelgradige Spasmen (10-30%), die jedoch die Mehrzahl aller Spasmen ausmachen

3.3 Rolle der NO-Synthasen bei der CO₂-induzierten Vasodilatation zerebraler Gefäße

3.3.1 Physiologische Parameter

Am Ende der Beobachtungszeit waren die physiologischen Parameter in allen Gruppen vergleichbar.

Tabelle 16: Tabellarische Darstellungen des pCO₂ und pO₂ nach 75 min Versuch.

Gruppe	pCO ₂	pO ₂
Wildtyp	37,60 ± 2,13	84,30 ± 10,0
eNOS ^{-/-}	38,74 ± 1,92	93,70 ± 4,89
nNOS ^{-/-}	37,76 ± 2,45	97,70 ± 10,7
iNOS ^{-/-}	41,35 ± 3,01	79,01 ± 7,20

MW ± SEM [Wildtyp (n = 8); eNOS^{-/-} (n = 8); nNOS^{-/-} (n = 8); iNOS^{-/-} (n = 8)]

3.3.2 Einfluss der NOS-Isoformen auf die CO₂-Gefäßreaktivität

Unter physiologischen Bedingungen zeigten sich bei allen Versuchstieren vergleichbare Werte; der MAP war im physiologischen Bereich, lediglich die eNOS-defizienten Mäuse wiesen zu Beginn der Untersuchung einen erhöhten arteriellen Blutdruck auf (Abbildung 31b, weiße Kreise). Dies entspricht den Ergebnissen vorangegangenen Studien unserer und anderer Arbeitsgruppen.³⁸¹⁻³⁸⁷ Nach Induktion einer Hyperkapnie (durch Inhalation eines 7,5%igen CO₂-Atemgasgemisches) kam es in der Kontrollgruppe zu der erwarteten physiologischen Reaktion: es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der zerebralen Durchblutung (Abbildung 31 a, schwarze Kurve). Der MAP blieb in dieser Phase konstant, bzw. fiel sogar gering (nichtsignifikant) ab (Abbildung 31 b, schwarze Kurve). iNOS-transgene Tiere zeigten einen ähnlichen Verlauf wie die Kontrolltiere auf (Abbildung 31, weiße Quadrate). Auch hier kam es zu einem signifikanten CO₂-induzierten CBF-Anstieg. Der MAP der iNOS^{-/-}-Mäuse verhielt sich während der CO₂-Inhalation, ähnlich der Kontrollgruppe, d.h. relativ konstant. nNOS^{-/-}-Mäuse zeigen eine deutlich reduzierte CBF Reaktion auf die Hyperkapnie, es kam zu lediglich einer geringgradigen und nichtsignifikanten Erhöhung des CBF auf maximal 106,38% ± 2,86% (Abbildung 31, weiße Dreiecke). eNOS^{-/-}-Mäuse zeigten interessanterweise unter Hyperkapnie keinerlei Anstieg der zerebralen Durchblutung, über die Zeit nahm der CBF sogar (nichtsignifikant) ab

(Abbildung 31 a, weiße Kreise). Der, initial im Vergleich zu den anderen Gruppen, eher erhöhte arterielle Blutdruck sank während der Phase der CO₂-Erhöhung deutlicher ab als in den anderen Gruppen (Abbildung 31 a, weiße Kreise).

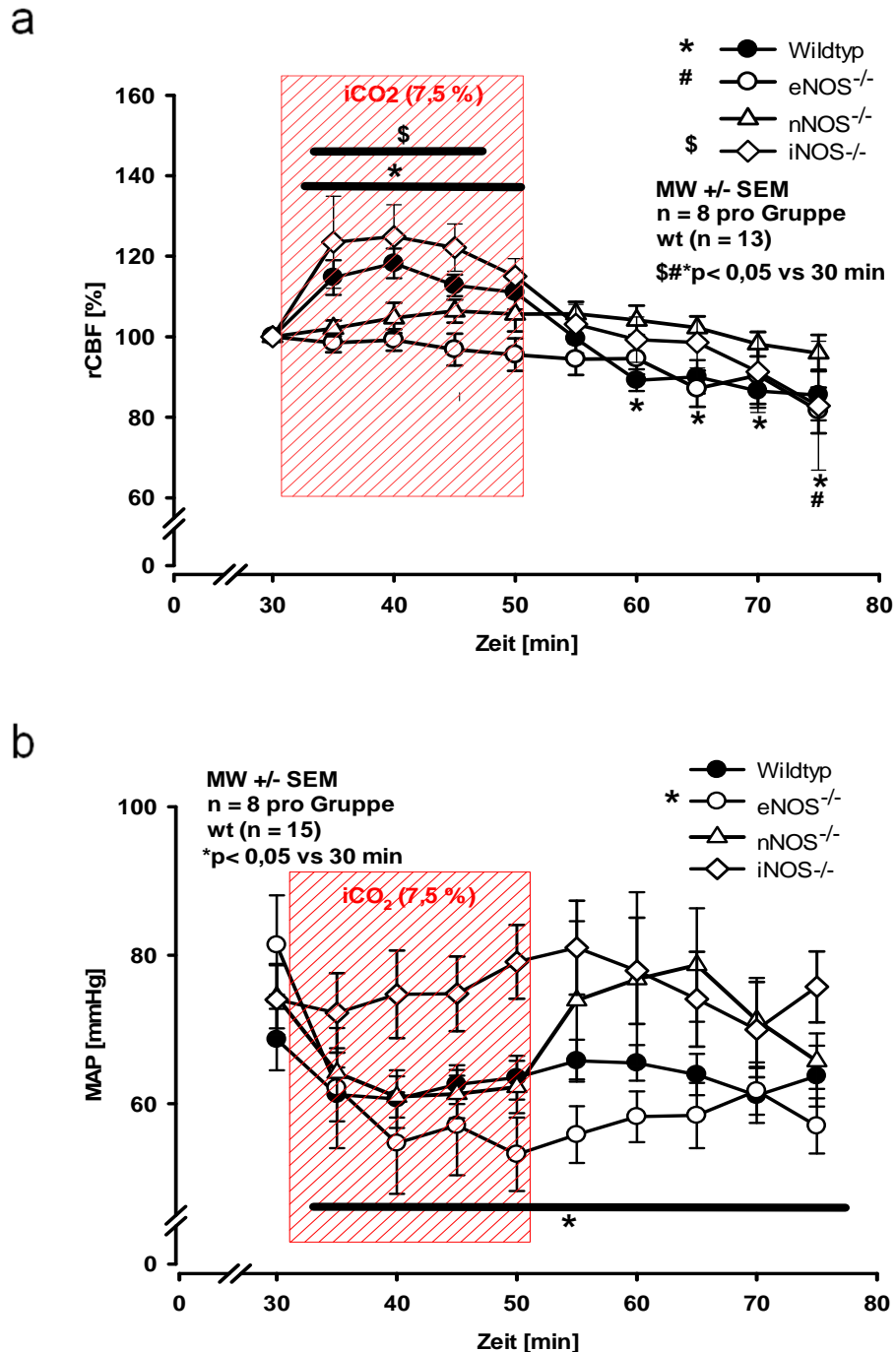


Abbildung 31: CO₂-Gefäßreaktivität in Wildtyp- und NOS-transgenen Mäusen. Während induzierter Hyperkapnie (rot schraffierter Bereich) zeigten nur Wt und iNOS-transgene Mäuse den erwarteten CBF-Anstieg. Er war in nNOS-defizienten Tieren deutlich reduziert. In eNOS-Knockout-Tieren blieb die Reaktion vollständig aus.

3.3.3 Vasodilatation unter induzierter Hyperkapnie - Wildtyp-Mäusen

Auf der Ebene der Mikrozirkulation zeigte sich, dass die Vasodilatation nach Induktion von Hyperkapnie im Wildtyp-Tier vor allem in den kleinen Gefäßen (Durchmesser 9,5 - 35 μm) stattfindet. Die ausgeprägteste Erweiterung lag bei 9,5-15 μm : $131\% \pm 0,8\%$ vs. Baseline in der 50. Min (Abbildung 32 a), während bei größeren Arteriolen (Durchmesser 35-65 μm) die Gefäßerweiterung zwar nachweisbar, jedoch deutlich schwächer ausgeprägt war (Abbildung 32 b). Der beobachtete durchblutungssteigernde Effekt von CO_2 im Gehirn wird also hauptsächlich durch die kleinen Gefäße mediiert.

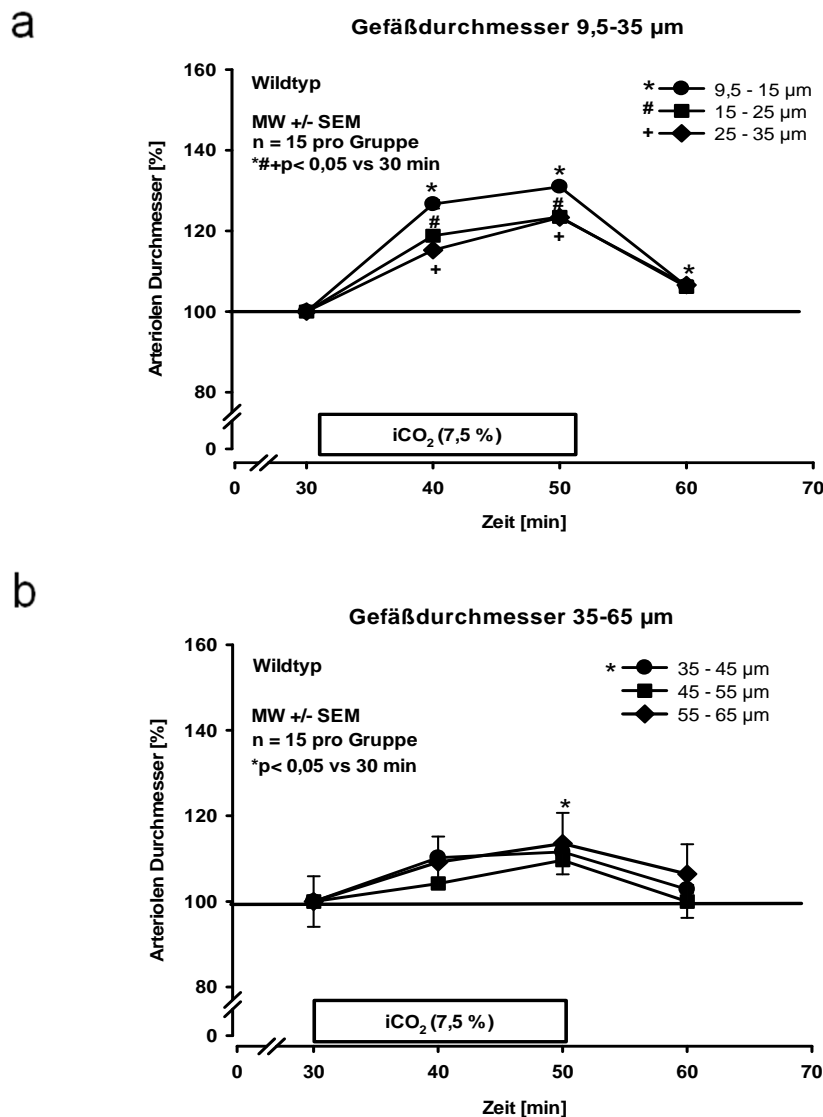


Abbildung 32: Vasodilatation unter induzierter Hyperkapnie – Wildtyp-Mäuse. (a) In Arteriolen mit 9,5-35 μm Durchmesser zeigt sich eine signifikante Vasodilatation (Maximum: 9,5-15 μm : $131\% \pm 0,8\%$, 15-25 μm : $123\% \pm 0,4\%$, 25-35 μm : $123\% \pm 0,7\%$, 20 min nach iCO_2). (b) Auch in größeren Gefäßen (35-65 μm) ist eine Vasodilatation nachweisbar, diese ist jedoch hier deutlich geringer ausgeprägt.

3.3.4 Vasodilatation unter induzierter Hyperkapnie – iNOS-defiziente Mäuse

iNOS^{-/-}-defiziente Mäuse zeigten unter erhöhtem pCO₂ Bedingungen ein ähnliches Verhalten wie Kontrolltiere. Auch hier zeigte sich die ausgeprägteste Vasodilatation in den kleinen Arteriolen (145% ± 1,3% vs. Baseline, in der 40. Min, Abbildung 33 a); in größeren Gefäßen war der Effekt sehr viel schwächer ausgeprägt, die Gefäße waren jedoch im Vergleich zur Baseline dennoch signifikant erweitert zur Baseline (Abbildung 33 b).

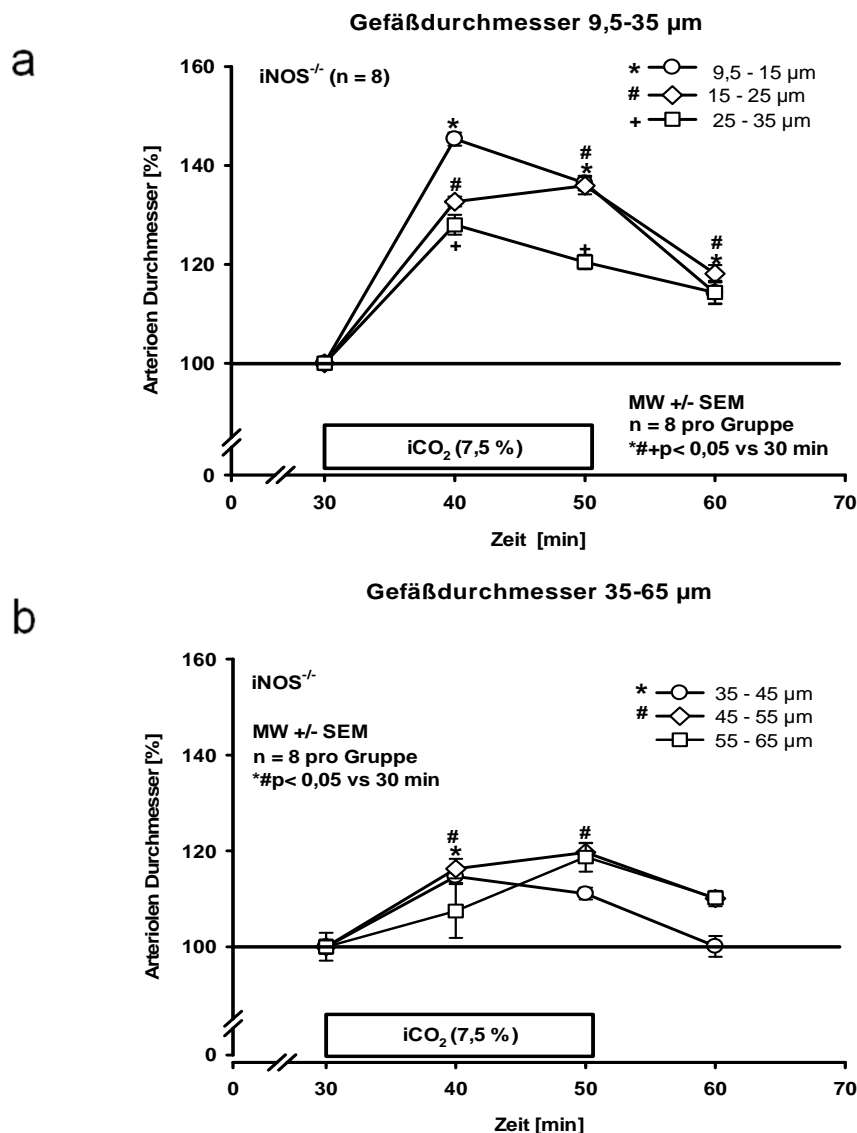


Abbildung 33: Vasodilatation unter induzierter Hyperkapnie – iNOS-defiziente Mäuse. (a) In Arteriolen mit 9,5-35 µm Durchmesser zeigt sich eine signifikante Vasodilatation (Maximum: 9,5-15 µm: 145% ± 1,3% 10 min nach iCO₂, 15-25 µm: 136% ± 1,7% 20 min nach iCO₂, 25-35 µm: 128% ± 2,0%, 10 min nach iCO₂). (b) Auch in größeren Gefäßen (35-65 µm) ist eine signifikante Vasodilatation nachweisbar (Maximum: 35-45 µm: 115% ± 1,3% und 45-55 µm: 120% ± 2,0%, 10 min nach iCO₂), diese ist jedoch wie bei den Wt-Tieren deutlich geringer ausgeprägt als in den kleineren Gefäßkategorien.

3.3.5 Vasodilatation unter induzierter Hyperkapnie – nNOS-defiziente Mäuse

Die nNOS^{-/-}-Mäuse wiesen unter erhöhtem pCO₂ (7,5 % iCO₂) eine im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich verminderte CO₂-induzierte Vasodilatation auf (15-25 µm: p = 0,006 nach 10 min iCO₂, p = 0,049 nach 20 min iCO₂; und p = 0,002 10 min nach iCO₂, 25-35 µm: p = 0,022 nach 10 min iCO₂). Im Vergleich zu den iNOS^{-/-}- Mäusen war ebenso eine verminderte CO₂-induzierte Vasodilatation zu erkennen (15-25 µm: p = 0,033 10 min nach iCO₂). Nur die kleineren Arteriolen mit einem Durchmesser von 9,5-25 µm wiesen eine geringe, jedoch im Vergleich zur Baseline signifikante Vasodilatation auf (116% ± 1,0% bei Kategorie 1 und 108% ± 1,1% bei Kategorie 2, Abbildung 34 a). Bei größeren Arteriolen (von 35-65 µm) war der vasodilatative Effekt nahezu nicht nachweisbar (Abbildung 34 b). Der Anteil von nNOS an der CO₂-induzierten Vasodilatation erscheint also vor allem in kleineren Gefäßen wichtig.

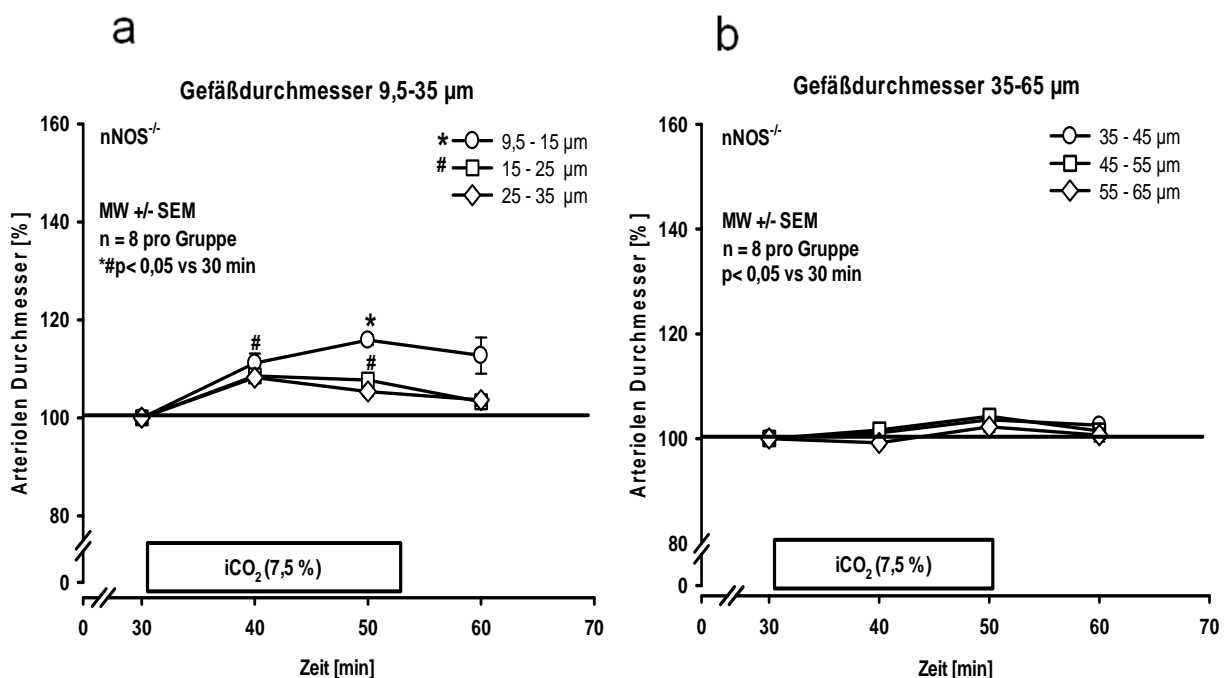


Abbildung 34: Vasodilatation unter induzierter Hyperkapnie – nNOS-defiziente Mäuse. Die CO₂-bedingte zerebrale Vasodilatation war in nNOS-Knockout-Mäusen signifikant erhöht und deutlich geringer ausgeprägt als in der Kontrollgruppe, vor allem im Kaliber 15-25 µm. (a) In Arteriolen mit 9,5-25 µm Durchmesser zeigt sich eine geringe Vasodilatation (Maximum: 9,5-15 µm: 116% ± 2% 20 min nach iCO₂ und 15-25 µm: 108% ± 1,0% 10 min nach iCO₂), während in größeren Gefäßen (b) eine Vasodilatation nahezu komplett ausblieb.

3.3.6 Vasodilatation unter induzierter Hyperkapnie – eNOS-defiziente Mäuse

Die auffälligsten Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten sich, wie in der CBF-Messung, auch auf der Ebene der Mikrozirkulation bei den eNOS^{-/-}-Mäusen. Vor allem war die Reaktion kleiner Arteriolen der eNOS^{-/-}-Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe besonders verringert (15-25 µm: $p = 0,005$ nach 10 min iCO₂, $p = 0,049$ nach 20 min iCO₂; und $p = 0,022$ 10 min nach iCO₂). Auch im Vergleich zu iNOS^{-/-}-Mäusen war der Gefäßdurchmesser deutlich geringer (9,5-15 µm: $p = 0,05$ nach 10 min iCO₂; 15-25 µm: $p = 0,001$ nach 10 min iCO₂, $p = 0,038$ nach 20 min iCO₂; 25-35 µm: $p = 0,028$ nach 10 min iCO₂). Bei größeren Arteriolen (von 35-65 µm) war der vasodilatative Effekt bei eNOS^{-/-}-Mäusen auch verringert (35-45 µm: $p = 0,026$ nach 20 min iCO₂ im Vergleich zur Kontrolle und $p = 0,003$ nach 10 min iCO₂ im Vergleich zu iNOS^{-/-}-Mäusen). In den Arteriolen mit 25-35 µm Durchmesser kam es zu einer geringfügigen Vasodilatation ($117\% \pm 1,0\%$, Abbildung 35 a), die auch nur zu einem Zeitpunkt (50 min) im Vergleich zur Baseline statistisch signifikant war. Der Anteil von eNOS an der CO₂-induzierten Vasodilatation erscheint also vor allem in kleineren Gefäßen wichtig.

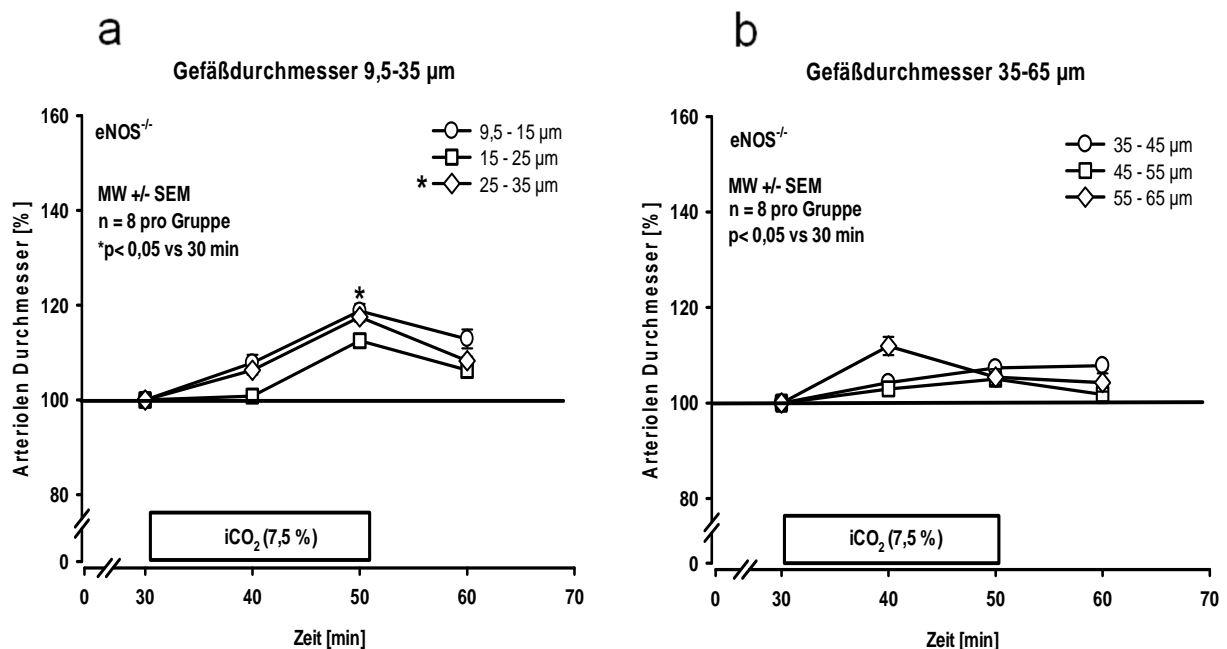


Abbildung 35: Vasodilatation unter induzierter Hyperkapnie – eNOS-defiziente Mäuse. Die CO₂-bedingte zerebrale Vasodilatation war deutlich geringer ausgeprägt als bei Wildtyp-Mäusen. Lediglich in Gefäßen der Kategorie 3 kam es zu einer geringen Vasodilatation (a), In größeren Arteriolen (b) hat iCO₂ nur eine ganz schwache Wirkung auf die Gefäße.

3.3.7 Vasodilatation unter induzierter Hyperkapnie der NOS-Isoformen in kleinen Arteriolen

Abbildung 36 zeigt für jeden Genotyp die Gefäßkategorie mit der ausgeprägtesten vasodilatatorischen Reaktion, d. h. Arteriolen mit einem Durchmesser zwischen 9,5 - 15 μm . Es ist deutlich erkennbar, dass die Arteriolen der Wildtyp- und iNOS^{-/-}-Gruppe im Vergleich zu nNOS- und vor allem eNOS-transgenen Tieren eine deutlich ausgeprägtere CO₂-Reaktivität zeigen.

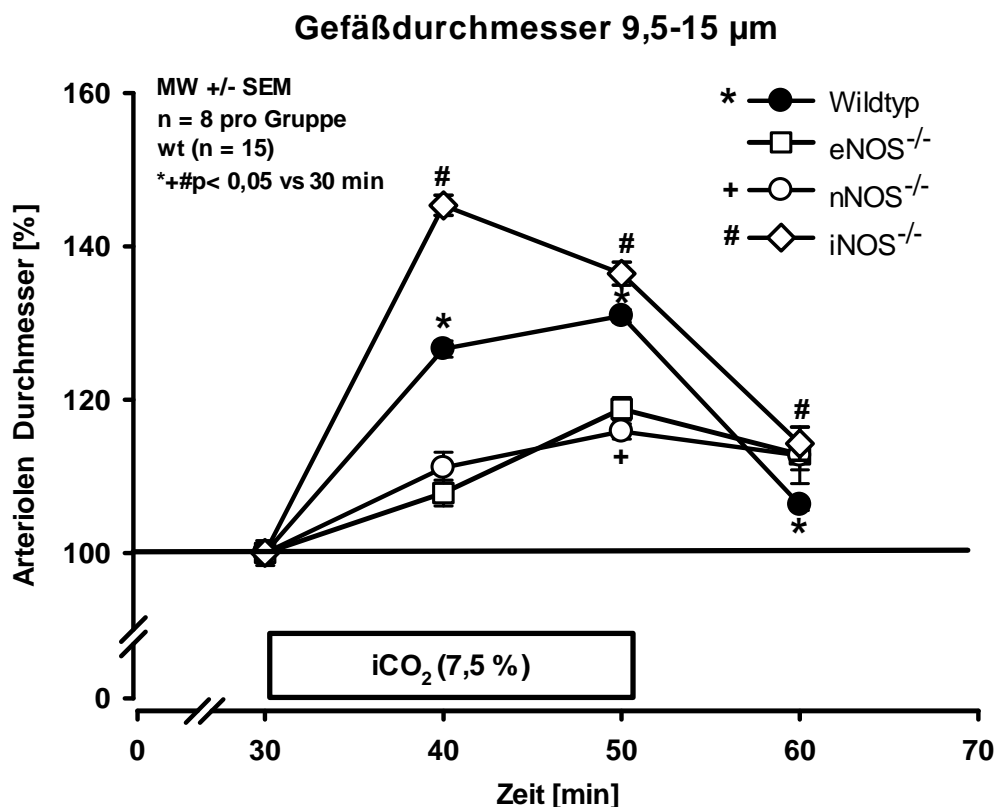


Abbildung 36: Einfluss der NOS- auf die CO₂-induzierte Vasodilatation, Gefäße mit einem Durchmesser von 9,5-15 μm .

3.3.8 Mögliche Rolle der NOS bei der Formation von Mikrovasospasmen

Bei der Untersuchung der zerebralen Mikrozirkulation im Rahmen der Untersuchung der CO₂-Reaktivität fielen bereits unter physiologischen Bedingungen charakteristische Gefäßveränderungen bei den NOS-transgenen Mäusen auf: die Arteriolen wiesen segmentale Konstriktionen auf, die an die Mikrovasospasmen, wie sie nach

Subarachnoidalblutung auftreten, erinnerten. Beispielbilder zeigt Abbildung 37. Neben den Versuchsgruppen ist in Abbildung 37 f beispielhaft, wie der Befund drei Stunden nach SAB zeigt. Daraufhin wurde das IVM-Protokoll angepasst und die zerebrale Mikrozirkulation der NOS-defizienten Tiere basierend auf den Versuchen nach SAB untersucht und ausgewertet. Für die Analyse wurden lediglich die ersten 10 min von der Baseline (insgesamt sind es 30 min Baseline) herangezogen.

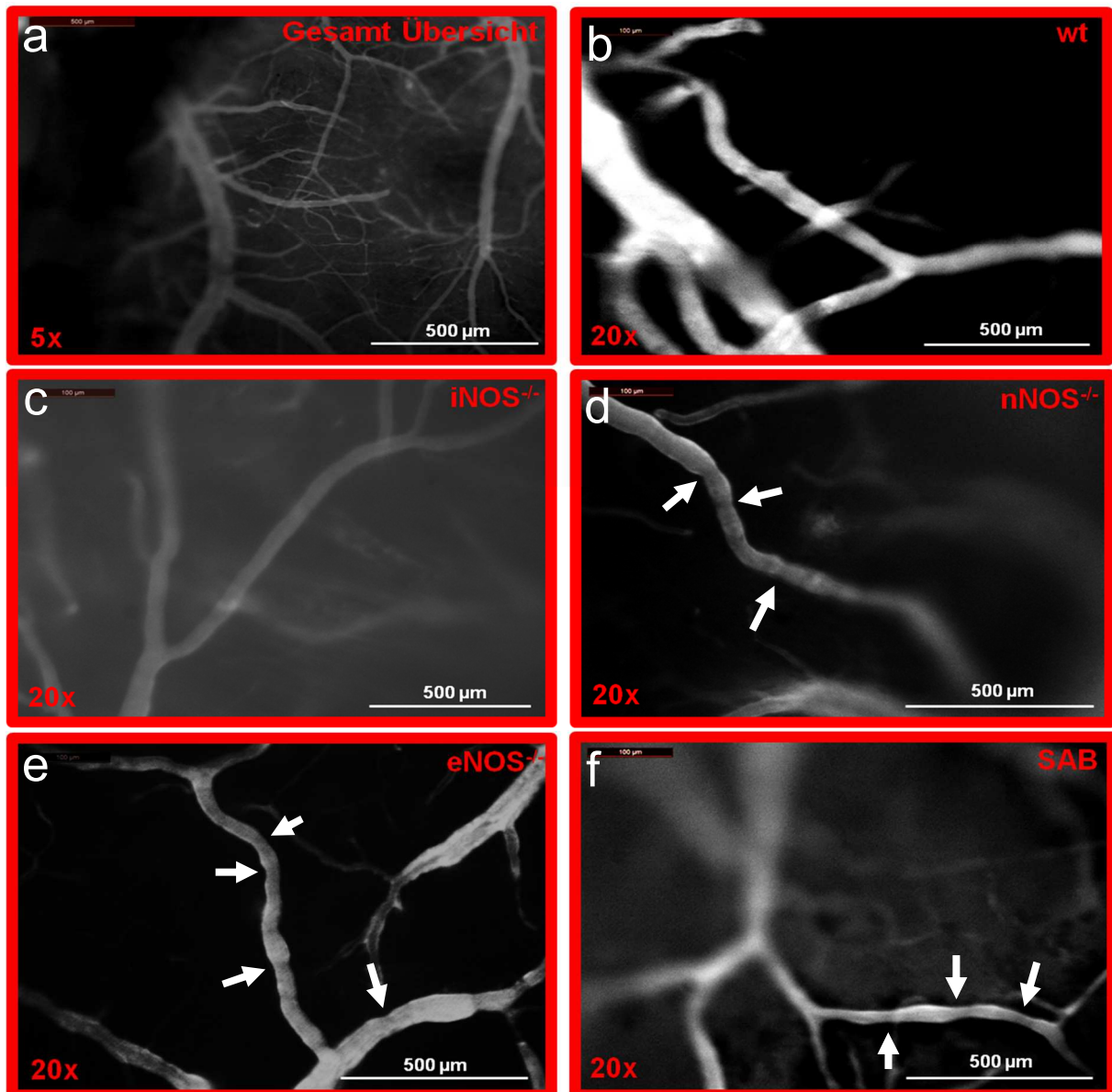


Abbildung 37: Beginnend mit einer Gesamtübersicht des zerebralen Mikrogefäßbaums durch IVM, konnte mit einer 20 fachen Vergrößerung (Immersionsobjektiv) Arteriolen, 9,5-35 µm, besichtigt und analysiert werden. Die Häufigkeit von MVS ergab sich wie folgt: **SAB > eNOS^{-/-} > nNOS^{-/-} > iNOS^{-/-}**. Die Wildtyp-Mäuse dienten als Kontrolle. Die weißen Pfeile weisen auf MVS hin.

eNOS^{-/-}-Mäuse wiesen insbesondere eine signifikante Anzahl von MVS in Arteriolen auf, mit Durchmessern von 15-25 µm. Dies gilt auch nNOS^{-/-}-Mäuse. Im Vergleich zu Wt-Tieren, die dieses Phänomen nur sehr vereinzelt zeigen, handelt es sich um einen signifikanten Unterschied (Abbildung 38 a). Die Ausprägung erinnert an das Vorkommen von Spasmen nach SAB, ist jedoch etwas geringer ausgeprägt. Die vorkommenden mikroarteriolen Konstriktionen sind – ebenfalls wie beim posthämorrhagischen MVS – hauptsächlich leicht- bis mittelgradig (10-40%).

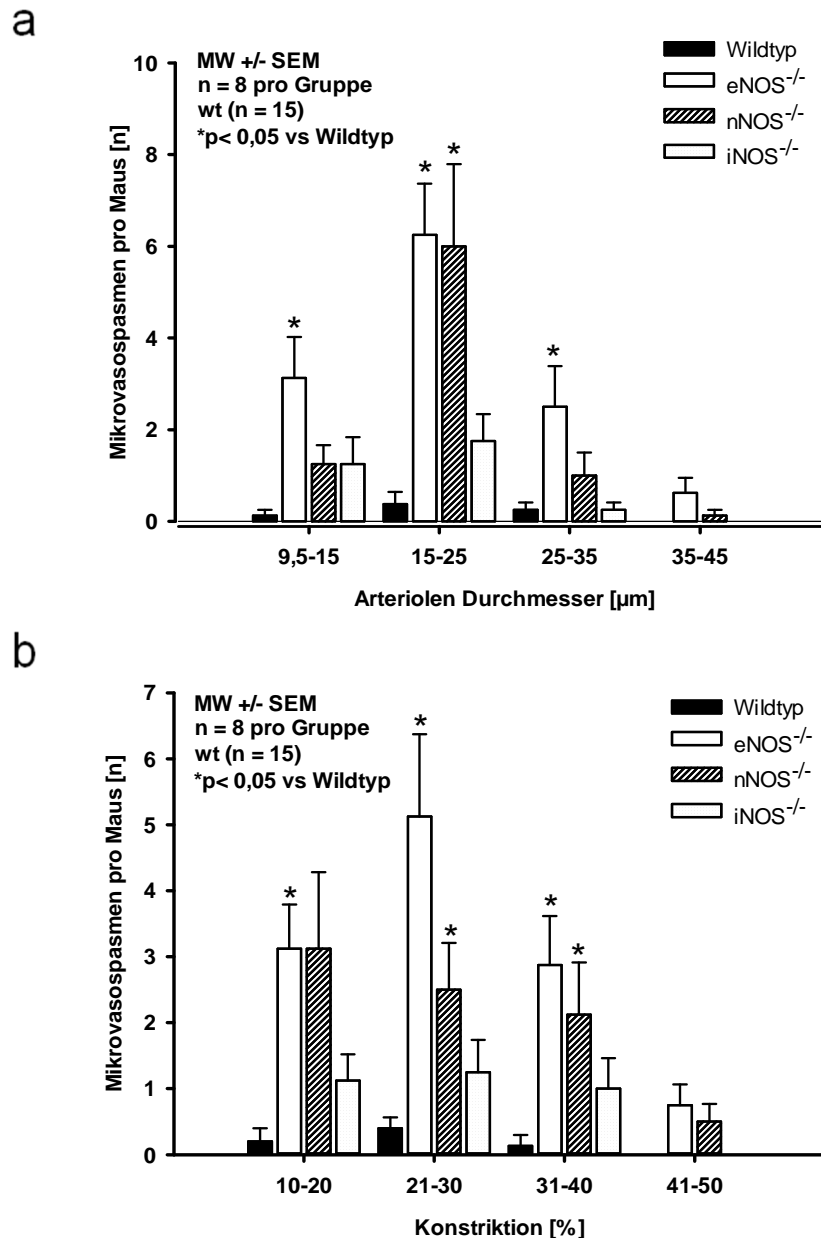


Abbildung 38: Vorkommen und Ausprägung von Mikrovasospasmen bei NOS-defizienten Mäusen. (a) eNOS^{-/-}- und weniger stark ausgeprägt die nNOS-defizienten Mäuse zeigen eine signifikante Anzahl von MVS v.a. in den kleinen Gefäßarteriolen (ähnlich wie bei SAB). (b) Die Spasmen sind, ebenfalls wie nach SAB, vor allem gering bis mittelgradig (10-40%).

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Auswahl der Versuchstiere

Nagetiere, insbesondere Mäuse, sind die am häufigsten verwendete Spezies in der Schlaganfallforschung, da sie aufgrund ihrer schnellen Reproduktionsfähigkeit, sowie ihrer kleinen Körpergröße kostengünstig und schnell gezüchtet werden können. Sie haben ein robustes Herz-Kreislauf-System, das die komplikationslose Durchführung von Langzeit-Narkosen ermöglicht. Ein Nachteil bei der Verwendung von Mäusen ist die Schwierigkeit der Durchführung von operativen Eingriffen. Das Problem kann jedoch durch die Anwendung mikrochirurgischer Techniken sowie die Verwendung entsprechend dimensionierter Instrumente (Mikroskop, Mikrosonden) behoben werden. Ein weiterer Nachteil ist, dass Mäuse kein gyrencephales Gehirn besitzen, was die Übertragbarkeit mancher Ergebnisse auf den Menschen nicht sicher gewährleistet. Ein großer Vorteil der Maus ist jedoch die Möglichkeit zur genetischen Manipulation durch die Verwendung von transgenen Mausmodellen, z.B. die Züchtung von Mäusen mit spezifischen Gendelektionen (Knock-Out-Maus). Wichtige Vorteile der Verwendung von Knockoutmäusen sind, dass das Deaktivieren eines Gens eine umfassendere und präzisere Ausschaltung ermöglicht als eine medikamentöse Blockade, zudem ist eine genetische Manipulation oft der einzige Weg zur Bestimmung der genauen Funktion eines Gens.³⁸⁸ NOS-Inhibitoren weisen eine geringe Selektivität bzgl. der verschiedenen NOS-Isoformen auf, aufgrund der schlechten Interaktionsfähigkeit der Inhibitoren mit der Arginin-Bindungsstelle.³⁸⁹ So ist die inhibitorische Potenz von 1400 W, NAP und L-VNIO für nNOS und eNOS schwach ausgeprägt.³⁸⁹⁻³⁹³ Lediglich für iNOS gibt es genügend selektive Inhibitoren, wie z.B. 1400 W, Aminoguanidin, Isothiourea. Ein weiterer Grund für die Verwendung eines Mausmodells in der vorliegenden Studie ist, dass die dünne Dura Mater und der schmale Subarachnoidalraum der Maus Epifluoreszenzmikroskopie bei intakter Dura erlaubt.¹²⁷ Dies ist von Vorteil, da hierdurch operationsbedingte Artefakte minimiert werden. Bei größeren Versuchstieren wie z.B. Ratten ist dies nicht möglich.³⁹⁴ Hier muss die Dura Mater entfernt werden und das Gehirn während der Messungen konstant mit einem künstlichem Liquor gespült werden.³⁹⁴ Dies ist sehr störanfällig, außerdem besteht die Gefahr der Entwicklung eines Hirnödems.

4.1.2 Anästhesie

Um Aussagen über die zerebrale Mikrozirkulation und insbesondere über dessen Veränderungen machen zu können, muss sichergestellt werden, dass die Untersuchungen unter physiologischen Bedingungen stattfinden. Veränderungen von systemischem Blutdruck, Körpertemperatur, $p\text{CO}_2$ und $p\text{O}_2$ können zu einer Beeinflussung der zerebralen Durchblutung führen. Deswegen ist wichtig, dass diese Parameter im Laufe eines Versuchs engmaschig überwacht und kontrolliert werden. In der vorliegenden Studie wurden die Versuchstiere mechanisch beatmet, die Temperatur konstant gehalten, die Atemparameter wurden kontinuierlich und nichtinvasiv mittels Mikrokapnometrie überwacht und angepasst. In einer vorangegangenen Studie³⁶² konnte gezeigt werden, dass mit dem in der Studie verwendeten Setup auch über eine längere Narkosedauer physiologische Parameter eingehalten werden können. Mehrfache Blutentnahmen zur Blutgasanalyse, welche aufgrund des geringen Blutvolumens der Maus schnell zur Hypotension führen können, werden so vermieden. Auch die Narkoseform kann die Versuchsergebnisse signifikant beeinflussen. Isofluran, das am häufigsten tierexperimentell meist verwendete volatile Betäubungsmittel^{395,396} entfaltet in vielerlei Hinsicht eine ähnliche Wirkung wie Halothan,³⁹⁷ das vasodilatativ wirkt.³⁹⁸ Isofluran führt dosisabhängig zu einer globalen CBF-Erhöhung sowie zum systemischen Blutdruckabfall und es beeinträchtigt die zerebrale Autoregulation.³⁹⁹ Isofluran kann auch neuroprotektiv wirken^{400,401} indem es nach zerebraler Ischämie die Infarktgröße,⁴⁰² die neuronale Apoptose (durch Hochregulierung von antiapoptotischen Faktoren wie MAP-Kinase),⁴⁰³⁻⁴⁰⁵ die Exzitotoxizität,^{29,183} das Hirnödem,⁴⁰⁶ und das neurologische Defizit vermindert⁴⁰⁶ sowie die Öffnung der Blut-Hirn-Schranke verringert.⁴⁰⁵ Ähnliche neuroprotektive Effekte lassen sich auch nach SAB nachweisen.^{407,408} Da auch andere volatile Anästhetika wie Sevofluran, Desfluran und Enfluran ähnliche Wirkungen wie Isofluran ausüben,³⁹⁵ wurde in der vorliegenden Studie für die intravitalmikroskopischen Untersuchungen, kein volatiles Anästhetikum, sondern eine Injektionsanästhesie aus Medetomidin, Fentanyl und Midazolam (MMF) verwendet. Die intraperitoneale Applikation dieser Kombination bei Nagern ist ein weitverbreitetes Verfahren in der Veterinärmedizin, das gut steuerbar ist und eine große therapeutische Breite aufweist. Entscheidend für diese Arbeit war allerdings, dass dieses Narkoseprotokoll keinen, bzw. nur einen geringen Einfluss auf die zerebrale Mikrozirkulation hat.³⁶² Auch für die

MMF-Narkose gibt es einige wenige Hinweise auf eine neuroprotektive Wirkung; so wurde gezeigt, dass es nach Retinaischämie unter MMF zu einer Zunahme der Zahl überlebender Ganglienzellen um etwa 40% des Ausgangswertes kommt,⁴⁰⁹ zudem wurde berichtet, dass die Narkose mit Medetomidin und alpha-2-Adrenorezeptor-Agonisten die Größe der Nekrose nach fokaler zerebraler Ischämie verringern kann,^{410,411} Midazolam scheint aber eine geringe neuroprotektive Wirkung zu haben.⁴¹² Die dargestellten Nebenwirkungen von MMF sind jedoch im Vergleich zu volatilen Anästhetika und anderen Injektionsnarkotika wie Propofol (fördert Blutdruckabfall und Atemdepression) und Ketamin (Blutdruck- und Herzfrequenzsteigernd) als gering einzuschätzen.

4.1.3 Beatmung der Versuchstiere

Das in der aktuellen Studie verwendete Narkoseprotokoll beinhaltet ein Opiat. Da Opiate atemdepressiv wirken, mussten die Versuchstiere intubiert und kontrolliert beatmet werden.⁴¹³ Die kontrollierte Beatmung hat Auswirkungen auf den Säure-Basen-Haushalt und die Blutgase des Versuchstieres. Die Beatmung muss daher so gesteuert werden, dass die Zielgrößen sich im physiologischen Bereich befinden, da Abweichungen vom Normbereich Auswirkungen auf die zerebrale Mikrozirkulation haben würden. Zielgrößen, die während des Versuchs besonders beachtet werden müssen sind Sauerstoffpartialdruck (pO_2), und Kohlendioxidpartialdruck (pCO_2), der mittels Mikrokapnometrie gemessen wird.^{362,414,415} Das Hauptziel der mechanischen Beatmung ist, den Erhalt des physiologischen $paCO_2$ im Blut, sowie eine ausreichende Gewebeoxygenierung für das Versuchstier zu garantieren.

4.1.4 Messung der zerebralen Durchblutung

Die Laser-Doppler-Flowmetrie ist eine nicht-invasive Methode zur Messung der lokalen zerebralen Durchblutung. Die Technik basiert auf dem Prinzip, dass monochromatisches Licht seine Wellenlänge ändert, wenn es von bewegten Objekten (wie z.B. Erythrozyten) reflektiert wird (Doppler-Effekt). Die Menge und die Frequenzänderung des reflektierten Lichts sind abhängig von der Anzahl und der Geschwindigkeit der im Gewebe zirkulierenden Blutzellen. So kann mit der LDF

zuverlässig jede dynamische Veränderung der zerebralen Durchblutung detektiert werden.⁴¹⁶⁻⁴²¹ Insgesamt ist die LDF für die Studie angemessen, weil sie a) nicht-invasiv ist b) eine zusätzliche Applikation von Tracern (z.B. Radionuklide) nicht erforderlich ist und c) ICP- und IVM-Messungen gleichzeitig zur CBF-Messung durchgeführt werden können. Zudem erfordern die Untersuchungen der vorliegenden Studie, dass schnelle kortikale Durchblutungsveränderungen verfolgt werden können; hierbei sind vor allem Änderungen im Vergleich zur Baseline von Interesse. Absolute Werte sind daher erforderlich. Nachteile der LDF-Methode liegen in der begrenzten Eindringtiefe. Andere Techniken, die für die Messung der zerebralen Durchblutung verwendet werden können, sind die Autoradiographie, die absolute CBF-Werte ermöglicht. Diese Methode ist allerdings technisch sehr aufwendig und erlaubt nur die Messung einzelner Messzeitpunkte da das Versuchstier für die Messung getötet werden muss.⁴²² Alle anderen Methoden zur Bestimmung der zerebralen Durchblutung, wie z.B. Perfusions-CT, Magnetresonanztomographie, oder Thermodilution, können wegen mangelnder Auflösung oder Größe der Sonden nicht bei Mäusen eingesetzt werden.

4.1.5 Wahl des SAB-Modells

Die Subarachnoidalblutung kann im Mausmodell entweder durch ein- oder mehrmalige Injektion von Blut in die Cisterna Magna,⁴²³⁻⁴²⁵ Perforation einer intracisternalen Vene⁴²⁶ oder Faden-Perforation der A. cerebri media^{127,427,428} vorgenommen werden. Das Cisterna-Magna-Injektions-Modell und das Venen-Dissektions-Modell können schnell durchgeführt werden, sind gut reproduzierbar und führen zu einem akuten Anstieg des ICP sowie zu einer Abnahme der CBF.⁴²³⁻⁴²⁶ Diese Veränderungen sind jedoch im Gegensatz zu den Vorgängen nach SAB im Patienten innerhalb kurzer Zeit nach Injektion reversibel. Negativ für die vorliegende Studie ist die bei beiden Modellen notwendige Verletzung der Dura mater, die die Intravitalmikroskopie behindern oder verfälschen kann. Beiden Modellen fehlt jedoch der plötzliche, heftige Blutungsbeginn und der endotheliale Schaden, die charakteristisch für die aneurysmatische SAB sind.²⁶⁷ Daher ist das MCA-Perforations-Modell aktuell das geeignetste Modell zur Erforschung der Pathophysiologie der SAB,⁴²⁷ da es die Folgen einer aneurysmatischen Subarachnoidalblutung (verzögerte zerebralen Vasospasmen,⁴²⁹⁻⁴³⁴ frühe

Vasospasmen in der Mikrozirkulation,^{133,184,435} neurologische Dysfunktionen,^{429,431-433,436,437} Hirnödem,^{436,437} Hydrocephalus,^{438,439} eine klinisch relevante Mortalität von ungefähr 30%,^{127,429,436,437} ICP-Anstieg^{127,184} und CBF-Abfall^{127,184}) am besten reproduziert und eine gute Standardisierbarkeit ermöglicht.⁴²⁷ Durch eine gleichzeitige und kontinuierliche Messung von ICP und CBF am MCA-Perforations-Modell wird kontrolliert, dass die Subarachnoidalblutung standardisiert ausgelöst werden kann.¹²⁷ Außerdem ist für unsere Studie die Tatsache von Vorteil, dass keine Öffnung der Dura Mater nötig ist und daher die Intravitalmikroskopie gut durchgeführt werden kann. Nachteile dieses Modells sind das nicht direkt kontrollierbare austretende Blutungsvolumen und die komplexe OP, die viel Erfahrung verlangt.

4.1.6 Intravitalmikroskopie

Die Visualisierung des Plasmas und somit der zerebralen pialen Mikrogefäße erfolgte durch repetitive i.v. Injektionen von Fluoresceinisothiocyanat-Dextran (FITC-Dextran).^{363,440} Ein Vorteil der i.v. Farbstoff-Injektion ist, dass eine Verletzung der Blut-Hirn-Schranke durch Extravasation des Farbstoffes sofort offensichtlich ist. Versuchstiere, bei denen dies der Fall war, wurden von der Analyse ausgeschlossen, da bei traumatischer Präparation eine artifizielle Beeinflussung der Versuchsergebnisse nicht auszuschließen bzw. wahrscheinlich ist. Eine Alternative zur Verwendung eines i.v. Farbstoffs wäre eine Maus (tie2GFP-Maus), das Green-Fluorescence-Protein (GFP) in Endothelzellen exprimiert.^{441,442} In so einer Maus könnte eine Hämodilution durch Injektion des Farbstoffs sowie mögliche systemische oder lokale Effekte des Farbstoffs vermieden werden. Der Nachteil einer tie2GFP-Maus in einem SAB-Modell könnte in der zusätzlichen genetischen Manipulation liegen, die den natürlichen Zustand der Mikrogefäße des Versuchstieres beeinflussen könnte sowie deren im Vergleich zum Farbstoff geringere Verfügbarkeit.

Die Eindringtiefe des Intravitalmikroskops liegt bei 50 µm. Damit können piale Gefäße, die für unsere Studie relevant waren, mit hoher optischer und zeitlicher Auflösung untersucht werden. Nichtinvasive, bildgebende Verfahren, wie die Computertomographie oder Magnetresonanztomographie, die in der klinischen Anwendung weit verbreitet sind, und auch in Tierversuchen zum Einsatz kommen, bieten zwar eine zunehmend bessere räumliche Auflösung, jedoch erlaubt nur die Intravitalmikroskopie

eine hochauflösende Analyse der Veränderung der zerebralen Mikrozirkulation in Echtzeit.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

Da viele Patienten nach SAB in der frühen und nur wenige in der verzögerten Hirnschädigungsphase, in der Spasmen der großen Hirngefäße auftreten, sterben, ist das Ziel der vorliegenden Arbeit zu untersuchen inwiefern die zerebrale Mikrozirkulation an der Frühmortalität nach SAB beteiligt ist und welche Mechanismen dieser Schädigung zugrundeliegen. Fast zwei Drittel der Todesfälle (ca. 61%) treten in den ersten 48 Stunden nach SAB auf.⁴⁴³ 25% der SAB Patienten⁴⁴³ erreichen nicht das Krankenhaus während 33-36% der SAB-Patienten behandelt werden aber dennoch an den Folgen der frühen Hirnschädigung nach SAB sterben.^{443,444} Der pathologische Zustand in den ersten 72 Stunden nach SAB wird durch Beeinträchtigung der zerebralen Autoregulation,¹³² Störung der Blut-Hirn-Schranke,¹³² Aktivierung von Entzündungswegen und Apoptose,¹³² Exzitotoxizität und oxidativer Stress, gestörte Kalzium Homöostase, Vasospasmen¹³² und durch Dysfunktion der zerebralen Mikrozirkulation¹⁸²⁻¹⁸⁴ charakterisiert. Diese Vorgänge werden zu gewissen Zeitpunkten in der frühen Hirnschädigungsphase durch Blut, und dessen Bestandteile, durch Aktivierung von Thrombozyten und durch transiente zerebrale Ischämie hervorgerufen.^{133-136,144}

4.2.1 Hämodynamische Veränderungen nach SAB

Nach Auslösung der SAB mittels dem MCA-Perforations-Modell zeigte sich ein massiver intrakranieller Druckanstieg (von 3 auf 100 mmHg) mit einem gleichzeitigen starken Abfall der regionalen zerebralen Durchblutung um ca. 85 % im Vergleich zum Ausgangswert.¹²⁷ Der intrakranielle Druckanstieg stoppte als dieser den systemischen-arteriellen Blutdruck erreichte.^{127,130} Durch die nun beginnende Verteilung des Blutes im gesamten Subarachnoidalraum fiel der ICP innerhalb von 5-8 min bis auf ca. 20 mmHg, während die zerebrale Durchblutung sich auf bis zu 80% des Ausgangswertes erholte. Auf diesem Niveau hielten sich der ICP und die CBF auch danach noch konstant. Ähnliche Werte werden auch bei SAB-Patienten die eine Re-Blutung erlitten

beobachtet. Dies legt nahe dass es bei der Maus und beim Menschen zu einem vergleichbaren Zeit- und Druckverlauf kommt.⁴⁴⁵

4.2.2 Effekt von iNO und den Endothelin-Rezeptor-Blocker auf den systemischen Blutdruck nach SAB

Eine arterielle Hypotension ist mit einer deutlichen Verschlechterung der Prognose von SAB-Patienten vergesellschaftet.⁴⁴⁶ Daher der MAP in dem Bereich zwischen 70 und 110 mmHg gehalten werden sollte.⁴⁴⁷ Die Verabreichung der NO-Vorstufe L-Arginin^{448,449} oder des NO-Donators S-Nitrosoglutathion (GSNO),¹⁴⁰ rufen eine deutliche Reduktion des Hirnschadens nach experimenteller SAB hervor. Allerdings verursacht GSNO einen drastischen, wenn auch vorübergehenden, Abfall des systemischen Blutdrucks.¹⁴⁰ Dieses Phänomen tritt auch nach der Anwendung von L-Arginine auf.^{450,451} Dagegen hat die NO-Inhalation, ein zugelassenes Verfahren zur Behandlung von pulmonaler Hypertonie, weder am Versuchstier noch beim Menschen eine nachteilige Wirkung auf den systemischen Blutdruck.^{452-454,270,455,456,457} Hohe iNO-Dosen wirken jedoch Blutdrucksenkend,^{458,459} vor allem ab Konzentrationen von 300 ppm.⁴⁵⁹ In unserer Studie, in der maximal 50 ppm inhaliertes NO appliziert wurden, konnte kein Effekt auf den systemischen Blutdruck nachgewiesen werden. Vielmehr tendiert der MAP bei den Kontrolltieren (mit induzierter SAB) um ca. 10 mmHg geringer zu sein als bei der iNO-Gruppe.

Clazosentan ist ein selektiver Endothelin-Rezeptor-Blocker,³⁷³⁻³⁷⁵ der experimentell und klinisch erfolgreich zur Behandlung von Spätvasospasmen nach SAB eingesetzt wurde.^{373,377} Nach der CONSCIOUS-1-Studie waren die Nebenwirkungen, die bei der Behandlung durch Clazosentan auftraten, u.a. Hypotonie.³⁵⁴ Die ET-1-Rezeptor-Blockade durch Clazosentan soll experimentell jedoch eine kontinuierliche Verringerung der zerebralen Durchblutung verhindern.³⁷⁹ In unsere Studie zeigte die ET-Rezeptor-Blockade bei gesunden Wildtyp-Mäusen, innerhalb von drei Stunden, keinen signifikanten Effekt auf den systemischen Blutdruck³⁷³ oder den CBF. Auch unterscheidet sich nach SAB der MAP der mit Clazosentan behandelten Tieren nicht von den Kontrolltieren.

4.2.3 Veränderung der zerebralen Mikrozirkulation nach SAB

4.2.3.1 Mikrovasospasmen

Der Vasospasmus und die daraus resultierende zerebrale Ischämie, sind die meist gefürchteten Komplikationen nach SAB. Frühere Untersuchungen waren vor allem auf den verzögerten zerebralen Makrovasospasmus fokussiert. Jedoch ist seit einigen Jahren bekannt, dass in den ersten 72 Stunden nach SAB auch die zerebrale Mikrozirkulation beeinträchtigt ist und damit zerebrale Mikrovasospasmen auftreten.¹⁸²⁻¹⁸⁴ Aufgrund der technischen Möglichkeiten werden in der Klinik nur qualitative Aussagen über den Durchmesser der großen Gefäße, wie der A. cerebri media und der A. cerebri anterior, getroffen. Eine Reduktion des Gefäßdurchmessers in einem dieser Gefäße kann jedoch durch eine ausreichende Kolateralisierung kompensiert werden. Die Frage, ob nicht auch die kleinen Widerstandsgefäße in Form von Arteriolen von Mikrovasospasmen betroffen sind, stand immer zur Debatte.⁴⁶⁰⁻⁴⁶² Gestützt wurde dies durch die Tatsache, dass der diagnostizierte Vasospasmus der großen Gefäße keinen positiven prädiktiven Wert bzgl. der neurologischen Defizite nach SAB aufweist. 2003 konnten von Uhl et al. erstmals der Nachweis erbracht werden, dass Mikrovasospasmen auch beim Menschen auftreten.¹⁸² Am Patienten war es jedoch nicht möglich, zu verschiedenen Zeitpunkten und an denselben Stellen qualitative und quantitative Aussagen über die entstandenen Mikrovasospasmen zu treffen. Somit ergab sich die Aufgabe, für die nähere Erforschung der Mikrovasospasmen ein Tiermodell zu etablieren. So konnten wir 2012 das erste Mal die Existenz von Mikrovasospasmen nach experimenteller SAB nachweisen.¹⁸⁴ Diese Befunde konnten in der aktuellen Arbeit reproduziert werden: 3-5 Stunden nach SAB treten akute Vasokonstriktionen überwiegend in Arteriolen geringen Durchmessers (9,5-25 µm) auf. Kapillaren hingegen wiesen fast keine Mikrovasospasmen auf, während Venolen überhaupt keine Vasospasmen aufwiesen. Die überwiegende Mehrzahl der arteriolen Mikrovaskospasmen ist mittelgradig, zwischen 10-40%. Freies Hämoglobin ist eine mögliche Ursache für diese Mikrovasokonstriktion.⁴⁶³ Abbildung 39 stellt schematisch die Ursachen der Mikrovasospasmenbildung dar.

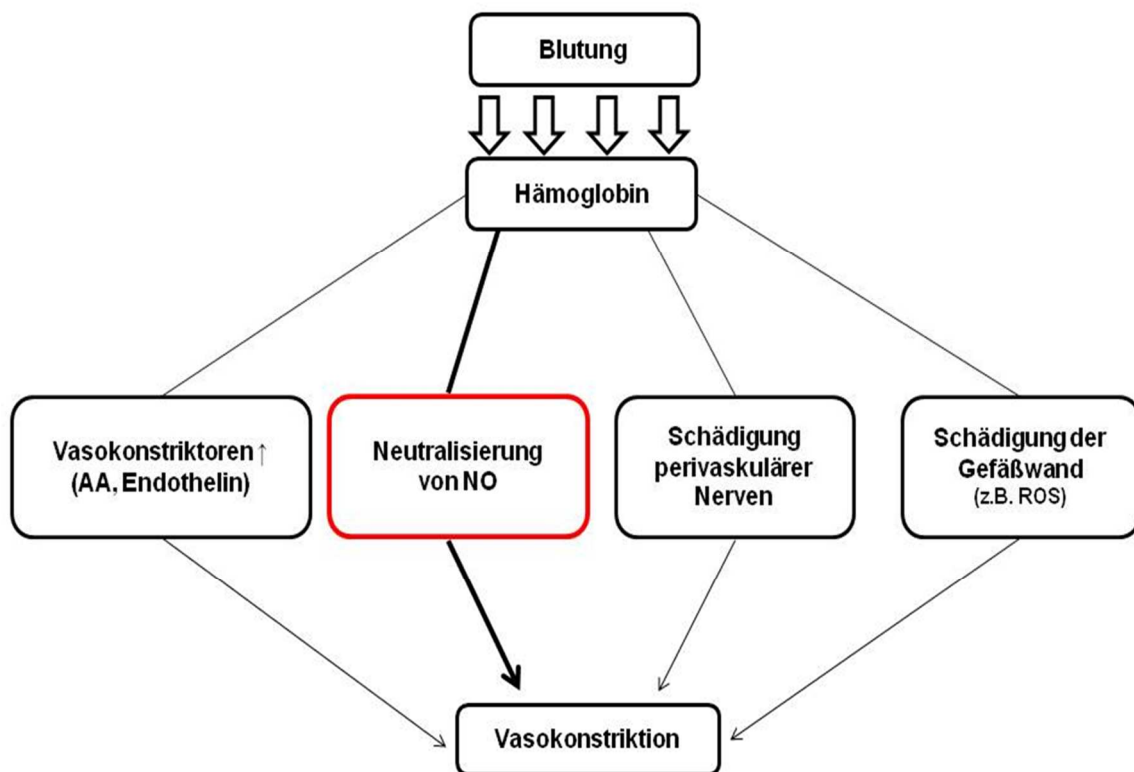


Abbildung 39: Mögliche Ursachen zur Mikrovasospasmen-Bildung

4.2.3.2 Effekt von iNO

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein endogener Vasodilator der direkt auf die glatten Gefäßmuskelzellen wirkt und zur Gefäßrelaxierung führt.²⁸² Damit es zur Gefäßrelaxierung kommt, wird unter physiologischen Bedingungen der NO-sGC-cGMP-Signaltransduktionsweg aktiviert.²⁰⁸ Nach SAB ist der NO/NOS-Weg gestört^{137,140,261} und dies könnte für die Genese und Entwicklung der frühen Hirnschädigung entscheidend sein.⁴⁶⁴⁻⁴⁷¹ Blutabbauprodukte, vor allem das Hämoglobin, sind für die Depletion von NO aus dem zerebrovaskulären System verantwortlich. Die NO-Depletion verursachte eine Verringerung der Expression von sGC,⁴⁷² sowie ein Anstieg der Hydrolyse-Rate von cGMP.⁴⁷³ Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit der Beeinträchtigung der NO vermittelten Vasodilatation nach SAB.⁴⁷³ In der vorliegenden Studie soll der durch SAB verursachte NO-Mangel durch iNO wieder hergestellt werden. Drei bis fünf Stunden nach SAB, weist iNO einen vasodilatativen Effekt auf spastische Arteriolen (9,5-25 µm) auf. Der vasodilatatorische

Effekt findet sofort nach Beginn der iNO statt. Nach 40 Minuten NO-Inhalation waren die MVS fast komplett verschwunden und 30 Minuten nach iNO-Stopp war die Zahl der Vasospasmen praktisch gleich gering geblieben. Während iNO verschwinden vor allem MVS, die einen Konstriktionsgrad zwischen 10-40% aufweisen. 30 Minuten nach iNO-Stopp blieb die Anzahl der leichten und mittelstarken MVS konstant gering. Durch unsere Studie erkennt man, dass die Beeinträchtigung der zerebralen Mikrozirkulation, mit Hilfe des inhalierten NO (50 ppm) aufgehoben werden kann. Das Inhalieren von 50 ppm NO hat keine negative Auswirkung auf den systemischen Blutdruck.²⁷⁰ Frühere Untersuchungen haben außerdem gezeigt, dass die NO-Inhalation nach SAB die Mortalität und das Hirnödem senkt.^{127,270} Die vorliegende Studie deutet darauf hin, dass diese Neuroprotektion durch eine Verbesserung der zerebralen Mikrozirkulation durch Reduktion des Mikrovasospasmus verursacht wird. Deswegen ist die NO-Inhalation eine vielversprechende Therapieoption in der frühen Phase nach Subarachnoidalblutung weil es die Homöostase der zerebralen Mikrozirkulation wiederherstellt.

4.2.3.3 Effekt der ET-1-Rezeptorblockade

ET-1 ist eines der stärksten Vasokonstriktoren in der zerebralen Zirkulation. Es wirkt hauptsächlich durch Andocken an den ET_A-Rezeptor.^{435,540} Clazosentan, ein selektiver ET_A-Rezeptor-Antagonist reduziert die Entwicklung von zerebralen Makrovasospasmen nach SAB.^{474,475} In der aktuellen Studie zeigte die ET1-Rezeptorblockade durch Clazosentan (10 mg/kg KG) einen präventiven Effekt auf die zerebrale Mikrozirkulation. Die ET-1-Rezeptor-Blockade führte zur Erweiterung von zerebralen Mikrogefäßen, vor allem von Arteriolen mit einem Kaliber zwischen 35-55 µm. Die kleineren Arteriolen (9,5-35 µm) wiesen keine signifikante Gefäßrelaxierung auf. Eine deutliche Abnahme von MVS findet sich vor allem in größere Arteriolen. 30 min nach Beendigung der Clazosentan-Gabe bleiben die Anzahl der MVS mit einem Konstriktionsgrad zwischen 21-30% deutlich reduziert. Auch eine Behandlung mit einem Endothelin-Rezeptor-Antagonisten scheint die Homöostase der zerebralen Mikrozirkulation wieder herstellen zu können. Der Effekt beschränkt sich im Vergleich zu iNO allerdings auf die größeren Arteriolen.

4.2.4 Rolle der NOS-Isoformen in der zerebralen Mikrozirkulation nach SAB

Die Regulation der Durchblutungsverteilung zwischen verschiedenen Hirnarealen ist entscheidend für die Kopplung von Gewebedurchblutung und Stoffwechsel. Auf der lokalen Ebene ist bekannt, dass Stickstoffmonoxid eine Schlüsselrolle bei der Modulation des mikrovaskulären Tonus und somit der lokalen Durchblutung des Gehirns spielt.^{228,476} Stickstoffmonoxid tritt mit anderen lokalen vasoaktiven Mediatoren (z.B. Prostaglandin und Endothelin) und mit dem neuronalen Netzwerk in Wechselwirkung, die für die Festlegung des Gefäßtonus und Durchblutung verantwortlich sind.^{246,534} Obwohl es drei verschiedene Isoformen der NO-Synthase (eNOS, nNOS, iNOS) gibt, ist allgemein akzeptiert, dass die lokale Regulation des Gefäßtonus hauptsächlich durch die Freisetzung von NO durch eNOS vermittelt wird.^{534,477} In dieser Arbeit sollte geklärt werden, welche NOS-Isoformen (endotheliale, neuronale oder induzierbare), insbesondere in der zerebralen mikrovaskulären Regulation beteiligt sind, und welche nach SAB beeinträchtigt wird.

Es ist bekannt, dass ein hyperkapnisches Milieu die NO Freisetzung aktiviert, und so die selektive Relaxation zerebraler Gefäße bei gesunden Tieren und Menschen induziert.^{313,478,479} Nach SAB reagierten die zerebralen Arteriolen jedoch nicht auf CO₂. Dieser Mangel an CO₂-Reaktionsfähigkeit wurde durch einen vollständigen Verlust von CO₂-induzierter Hyperämie begleitet. Darüber hinaus zeigen Daten aus unserer Arbeitsgruppe, dass eine Erhöhung des arteriellen CO₂-Partialdrucks nicht in der Lage ist, spastische Mikrogefäße zu dilatieren, und die zerebrale Durchblutung nach SAB zu erhöhen.⁴⁸⁰ Ähnliche Befunde wurden auch bei SAB-Patienten erhoben.^{182,183}

Auch in der aktuellen Arbeit konnte durch Inhalation von 7,5% CO₂ die Hirndurchblutung bei Wildtyp-Mäusen signifikant erhöht werden. Auch iNOS-defiziente-Mäuse zeigten im hyperkapnischen Milieu, deutlich erhöhte CBF-Werte. bei eNOS^{-/-}- und nNOS^{-/-}-Mäusen zeigten nach Inhalation von CO₂ allerdings keine wesentliche Erhöhung der zerebralen Durchblutung.

Während der CO₂-Inhalation sind die Arteriolen mit einem Kaliber zwischen 9,5 und 45 µm vor allem bei Wildtyp-, wie auch bei iNOS^{-/-}-Mäusen deutlich erweitert. eNOS- und nNOS-defiziente Mäuse zeigten dagegen im hyperkapnischen Milieu (7,5% iCO₂) eine schwache CO₂-Reaktivität der Arteriolen.

Interessanterweise zeigten NOS-defiziente-Mäuse bereits unter Kontrollbedingungen Mikrovasospasmen. Diese traten vor allem in eNOS^{-/-}-defizienten Mäusen auf, gefolgt von nNOS^{-/-}-Mäusen und zuletzt iNOS^{-/-}-Mäusen. Ein ähnliches Bild ist auch bei SAB-Mäusen zu finden. In den drei erwähnten Knockoutmäusegruppen waren die MVS leicht oder mittelgradig (10-40%). Die Ähnlichkeit zwischen den bei eNOS und nNOS defizienten Tieren und nach SAB beobachteten Mikrovasospasmen lässt darauf schließen, dass NO möglicherweise an der Bildung von Mikrovasospasmen nach SAB beteiligt ist. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass inhaliertes NO zu einer massiven Verminderung der Mikrovasospasmen nach SAB führt.

Der Grund für die erwähnten pathologischen Veränderungen der zerebralen Mikrozirkulation nach SAB liegen daher aller Wahrscheinlichkeit nach in der gestörten Funktionalität von endothelialen NOS und neuronalen NOS. Ein möglicher molekularer Mechanismus ist die funktionelle Entkopplung der eNOS vom ihrem Co-Faktor Tetrahydrobiopterin (BH4). Diese geschieht unter ischämischen Bedingungen, und hat zur Folge, dass die eNOS statt NO Superoxidanion produziert.^{319,320,200,481,482} Ausserdem könnte das asymmetrische Dimethylarginin (ADMA), ein endogener eNOS-Inhibitor, der in der zerebrospinalen Flüssigkeit von SAB-Patienten vorkommt,⁴⁶⁸ auch für die Entstehung von Mikrovasospasmen verantwortlich sein. Ein erhöhter ET-1 Spiegel im Gehirn, nach SAB, ist auch verantwortlich für die Beeinträchtigung der NO-Produktion. Diese Beeinträchtigung wird verursacht über die isoformspezifische Protein-Kinase-C-vermittelte Hemmung der eNOS-Expression.³⁵²

Bemerkenswert ist, dass nach Applikation von S-Methyl-L-Thiocitrullin (SMTC) — einem nNOS-Inhibitor —, die Durchblutung des menschlichen Unterarms abnahm.⁴⁸³ Dadurch zeigen Capettini et al., dass nicht nur die eNOS, sondern auch die nNOS eine wichtige Rolle in der Vasorelaxation spielt.⁴⁸⁴ Da die nNOS, der eNOS in Aufbau, Struktur und Regulation sehr ähnlich ist, könnte ein ähnliches Entkopplungsphänomen wie bei eNOS auch bei der nNOS stattfinden und zu einer dysfunktionellen zerebralen Mikrogefäßregulation führen. Diese Annahme wird unterstützt durch die Beobachtung, dass die pharmakologische Hemmung der nNOS durch den selektiven Inhibitor 7-Nitroindazol (7-NI), eine starke Entkopplung der hämodynamischen von der neuronalen Aktivität zur Folge hat.⁴⁸⁵

5. Zusammenfassung

Die frühe Beeinträchtigung der zerebralen Mikrozirkulation ist entscheidend für die Pathophysiologie der Subarachnoidalblutung (SAB). Das Vorkommen von Vasospasmen in zerebralen Mikrogefäßen ist wahrscheinlich einer der Mechanismen, der für posthämorrhagische Ischämie bei SAB-Patienten verantwortlich ist.¹⁸² Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Vasospasmen ab der vierten Stunde nach SAB vor allem in zerebralen Arteriolen vermehrt vorkommen. Die Gabe von inhaliertem Stickstoffmonoxid (iNO) konnte die Anzahl von zerebralen Mikrovasospasmen nach SAB um 85% reduzieren. Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass Spasmen der zerebralen Mikrozirkulation maßgeblich an der Perfusionsstörung nach SAB beteiligt sind. Damit wurde auch die Hypothese bestätigt, dass post-hämorrhagische Mikrovasospasmen auf dem Boden einer lokalen NO-Depletion entstehen. Dies wurde durch Untersuchungen an eNOS defizienten Tieren bestätigt, die bereits unter Kontrollbedingungen ausgeprägte Mikrovasospasmen aufzeigen. Auf Grund seiner ausgesprochen positiven Wirkung auf die zerebralen Mikrovasospasmen, seines gut definierten und niedrigen Nebenwirkungsprofils und seiner einfachen Anwendbarkeit, könnte die Inhalation von NO ein potentes Mittel zur Behandlung der post-hämorrhagischen Ischämie sein. Die Endothelin-Rezeptor-Blockade durch Clazosentan, die bisher Anwendung in der verzögerten Phase bei SAB-Patienten fand, um Arterien zu relaxieren und Vasospasmen zu reduzieren, zeigt auch in der Frühphase nach SAB, eine gefäßrelaxierende Wirkung, vor allem in Arteriolen mit einem Kaliber zwischen 35-55 µm. Eine deutliche Reduzierung von MVS kann man vor allem in den größeren Arteriolen beobachten. Diese Befunde bestätigen die nicht signifikante Wirkung von Clazosentan auf das Outcome von SAB-Patienten und könnten darauf hinweisen, dass iNO oder die Kombination von iNO und Clazosentan eine vielversprechendere Therapieform der SAB darstellen könnte.

6. Literaturverzeichnis

1. Hatano S. Experience from a multicentre stroke register: a preliminary report. *Bulletin of the World Health Organization*. 1976;54(5):541-553.
2. Eschenfelder Ch C, Zeller JA, Stingele R. [Stroke: causes and classification]. *Hamostaseologie*. 2006;26(4):298-308.
3. de Rooij NK, Linn FH, van der Plas JA, Algra A, Rinkel GJ. Incidence of subarachnoid haemorrhage: a systematic review with emphasis on region, age, gender and time trends. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. 2007;78(12):1365-1372.
4. Odom MJ, Zuckerman SL, Mocco J. The role of magnesium in the management of cerebral vasospasm. *Neurology Research International*. 2013;2013:943914.
5. Konczalla J, Platz J, Schuss P, Vatter H, Seifert V, Guresir E. Non-aneurysmal non-traumatic subarachnoid hemorrhage: patient characteristics, clinical outcome and prognostic factors based on a single-center experience in 125 patients. *BMC Neurology*. 2014;14:140.
6. van Gijn J, Kerr RS, Rinkel GJ. Subarachnoid haemorrhage. *Lancet*. 2007;369(9558):306-318.
7. Rodriguez-Rodriguez A, Egea-Guerrero JJ, Ruiz de Azua-Lopez Z, Murillo-Cabezas F. Biomarkers of vasospasm development and outcome in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Journal of the Neurological Sciences*. 2014;341(1-2):119-127.
8. van Gijn J, Rinkel GJ. Subarachnoid haemorrhage: diagnosis, causes and management. *Brain . Journal of Neurology*. 2001;124(Pt 2):249-278.
9. Juvela S. Aspirin and delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 1995;82(6):945-952.
10. Lovelock CE, Rinkel GJ, Rothwell PM. Time trends in outcome of subarachnoid hemorrhage: Population-based study and systematic review. *Neurology*. 2010;74(19):1494-1501.
11. Feigin VL, Lawes CM, Bennett DA, Anderson CS. Stroke epidemiology: a review of population-based studies of incidence, prevalence, and case-fatality in the late 20th century. *The Lancet. Neurology*. 2003;2(1):43-53.
12. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, et al. Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2011;123(4):e18-e209.

13. Ingall T, Asplund K, Mahonen M, Bonita R. A multinational comparison of subarachnoid hemorrhage epidemiology in the WHO MONICA stroke study. *Stroke*. 2000;31(5):1054-1061.
14. Linn FH, Rinkel GJ, Algra A, van Gijn J. Incidence of subarachnoid hemorrhage: role of region, year, and rate of computed tomography: a meta-analysis. *Stroke*. 1996;27(4):625-629.
15. Steiner T, Juvela S, Unterberg A, et al. European Stroke Organization guidelines for the management of intracranial aneurysms and subarachnoid haemorrhage. *Cerebrovascular Diseases*. 2013;35(2):93-112.
16. Fujinaka T, Yoshimine T, Mashimo T. [Management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage]. Masui. *The Japanese Journal of Anesthesiology*. 2012;61(9):962-970.
17. Inagawa T. Trends in incidence and case fatality rates of aneurysmal subarachnoid hemorrhage in Izumo City, Japan, between 1980-1989 and 1990-1998. *Stroke*. 2001;32(7):1499-1507.
18. Ohkuma H, Fujita S, Suzuki S. Incidence of aneurysmal subarachnoid hemorrhage in Shimokita, Japan, from 1989 to 1998. *Stroke*. 2002;33(1):195-199.
19. Sarti C, Tuomilehto J, Salomaa V, et al. Epidemiology of subarachnoid hemorrhage in Finland from 1983 to 1985. *Stroke*. 1991;22(7):848-853.
20. Magnetic Resonance Angiography in Relatives of Patients with Subarachnoid Hemorrhage Study G. Risks and benefits of screening for intracranial aneurysms in first-degree relatives of patients with sporadic subarachnoid hemorrhage. *The New England Journal of Medicine*. 1999;341(18):1344-1350.
21. Rinkel GJ. Natural history, epidemiology and screening of unruptured intracranial aneurysms. *Revue Neurologique*. 2008;164(10):781-786.
22. Rinkel GJ, Djibuti M, Algra A, van Gijn J. Prevalence and risk of rupture of intracranial aneurysms: a systematic review. *Stroke*. 1998;29(1):251-256.
23. Baumann F, Khan N, Yonekawa Y. Patient and aneurysm characteristics in multiple intracranial aneurysms. *Acta Neurochirurgica. Supplement*. 2008;103:19-28.
24. Venti M. Subarachnoid and intraventricular hemorrhage. *Frontiers of Neurology and Neuroscience*. 2012;30:149-153.
25. Samaniego EA, Dabus G, Fuentes K, Linfante I. Endovascular treatment of severe vasospasm in nonaneurysmal perimesencephalic subarachnoid hemorrhage. *Neurocritical Care*. 2011;15(3):537-541.

26. Kapadia A, Schweizer TA, Spears J, Cusimano M, Macdonald RL. Nonaneurysmal perimesencephalic subarachnoid hemorrhage: diagnosis, pathophysiology, clinical characteristics and long-term outcome. *World Neurosurgery*. 2014;82(6):1131-1143
27. Hop JW, Rinkel GJ, Algra A, van Gijn J. Case-fatality rates and functional outcome after subarachnoid hemorrhage: a systematic review. *Stroke*. 1997;28(3):660-664.
28. Schievink WI, Wijdicks EF, Parisi JE, Piepgras DG, Whisnant JP. Sudden death from aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurology*. 1995;45(5):871-874.
29. Truelsen T, Bonita R, Duncan J, Anderson NE, Mee E. Changes in subarachnoid hemorrhage mortality, incidence, and case fatality in New Zealand between 1981-1983 and 1991-1993. *Stroke*. 1998;29(11):2298-2303.
30. Bederson JB, Awad IA, Wiebers DO, et al. Recommendations for the management of patients with unruptured intracranial aneurysms: A Statement for healthcare professionals from the Stroke Council of the American Heart Association. *Journal of Cerebral Circulation*. 2000;31(11):2742-2750.
31. Hop JW, Rinkel GJ, Algra A, van Gijn J. Quality of life in patients and partners after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 1998;29(4):798-804.
32. Mayer SA, Kreiter KT, Copeland D, et al. Global and domain-specific cognitive impairment and outcome after subarachnoid hemorrhage. *Neurology*. 2002;59(11):1750-1758.
33. Powell J, Kitchen N, Heslin J, Greenwood R. Psychosocial outcomes at three and nine months after good neurological recovery from aneurysmal subarachnoid haemorrhage: predictors and prognosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. 2002;72(6):772-781.
34. Hackett ML, Anderson CS. Health outcomes 1 year after subarachnoid hemorrhage: An international population-based study. The Australian Cooperative Research on Subarachnoid Hemorrhage Study Group. *Neurology*. 2000;55(5):658-662.
35. Huang J, van Gelder JM. The probability of sudden death from rupture of intracranial aneurysms: a meta-analysis. *Neurosurgery*. 2002;51(5):1101-1105.
36. Broderick JP, Viscoli CM, Brott T, et al. Major risk factors for aneurysmal subarachnoid hemorrhage in the young are modifiable. *Stroke*. 2003;34(6):1375-1381.
37. Feigin VL, Rinkel GJ, Lawes CM, et al. Risk factors for subarachnoid hemorrhage: an updated systematic review of epidemiological studies. *Stroke*. 2005;36(12):2773-2780.

38. Teunissen LL, Rinkel GJ, Algra A, van Gijn J. Risk factors for subarachnoid hemorrhage: a systematic review. *Stroke*. 1996;27(3):544-549.
39. Schievink WI, Michels VV, Piepgras DG. Neurovascular manifestations of heritable connective tissue disorders. A review. *Stroke*. 1994;25(4):889-903.
40. Qureshi AI, Suri MF, Yahia AM, et al. Risk factors for subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 2001;49(3):607-612.
41. Okamoto K, Horisawa R, Kawamura T, et al. Family history and risk of subarachnoid hemorrhage: a case-control study in Nagoya, Japan. *Stroke*. 2003;34(2):422-426.
42. Lozano AM, Leblanc R. Familial intracranial aneurysms. *Journal of Neurosurgery*. 1987;66(4):522-528.
43. Leblanc R. Familial cerebral aneurysms. A bias for women. *Stroke*. 1996;27(6):1050-1054.
44. Ronkainen A, Hernesniemi J, Puranen M, et al. Familial intracranial aneurysms. *Lancet*. 1997;349(9049):380-384.
45. Bromberg JE, Rinkel GJ, Algra A, van den Berg UA, Tjin ATML, van Gijn J. Hypertension, stroke, and coronary heart disease in relatives of patients with subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 1996;27(1):7-9.
46. Schievink WI, Torres VE, Piepgras DG, Wiebers DO. Saccular intracranial aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 1992;3(1):88-95.
47. Brisman JL, Song JK, Niimi Y, Berenstein A. Treatment options for wide-necked intracranial aneurysms using a self-expandable hydrophilic coil and a self-expandable stent combination. *AJNR. American Journal of Neuroradiology*. 2005;26(5):1237-1240.
48. Schievink WI. Intracranial aneurysms. *The New England Journal of Medicine*. 1997;336(1):28-40.
49. Starke RM, Chalouhi N, Ali MS, et al. The role of oxidative stress in cerebral aneurysm formation and rupture. *Current Neurovascular Research*. 2013;10(3):247-255.
50. Priebe HJ. Aneurysmal subarachnoid haemorrhage and the anaesthetist. *British Journal of Anaesthesia*. 2007;99(1):102-118.
51. Poeck K. [Heinz Ganshirt --forerunner of research on cerebrovascular diseases in Germany]. *Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie*. 2001;69 Suppl 1:S45-47.

52. Broderick JP, Adams HP, Jr., Barsan W, et al. Guidelines for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage: A statement for healthcare professionals from a special writing group of the Stroke Council, American Heart Association. *Stroke*. 1999;30(4):905-915.
53. Ebina K, Shimizu T, Sohma M, Iwabuchi T. Clinico-statistical study on morphological risk factors of middle cerebral artery aneurysms. *Acta Neurochirurgica*. 1990;106(3-4):153-159.
54. Ferguson GG. Physical factors in the initiation, growth, and rupture of human intracranial saccular aneurysms. *J Neurosurg*. 1972;37(6):666-677.
55. Kassell NF, Torner JC. Size of intracranial aneurysms. *Neurosurgery*. 1983;12(3):291-297.
56. Orz Y, Kobayashi S, Osawa M, Tanaka Y. Aneurysm size: a prognostic factor for rupture. *British Journal of Neurosurgery*. 1997;11(2):144-149.
57. Rosenorn J, Eskesen V. Does a safe size-limit exist for unruptured intracranial aneurysms? *Acta Neurochirurgica*. 1993;121(3-4):113-118.
58. Suzuki J, Ohara H. Clinicopathological study of cerebral aneurysms. Origin, rupture, repair, and growth. *J Neurosurg*. 1978;48(4):505-514.
59. Wiebers DO, Whisnant JP, Sundt TM, Jr., O'Fallon WM. The significance of unruptured intracranial saccular aneurysms. *J Neurosurg*. 1987;66(1):23-29.
60. Wiebers DO, Whisnant JP, Huston J, 3rd, et al. Unruptured intracranial aneurysms: natural history, clinical outcome, and risks of surgical and endovascular treatment. *Lancet*. 2003;362(9378):103-110.
61. Yoshimoto T, Mizoi K. Importance of management of unruptured cerebral aneurysms. *Surgical Neurology*. 1997;47(6):522-525.
62. Zacks DJ, Russell DB, Miller JD. Fortuitously discovered intracranial aneurysms. *Archives of Neurology*. 1980;37(1):39-41.
63. Jeong YG, Jung YT, Kim MS, Eun CK, Jang SH. Size and location of ruptured intracranial aneurysms. *Journal of Korean Neurosurgical Society*. 2009;45(1):11-15.
64. Sughrue ME, Saloner D, Rayz VL, Lawton MT. Giant intracranial aneurysms: evolution of management in a contemporary surgical series. *Neurosurgery*. 2011;69(6):1261-1270.
65. Grooters GS, Sluzewski M, Tijssen CC. How often is thunderclap headache caused by the reversible cerebral vasoconstriction syndrome? *Headache*. 2014;54(4):732-735.

66. Bederson JB, Connolly ES, Jr., Batjer HH, et al. Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a statement for healthcare professionals from a special writing group of the Stroke Council, American Heart Association. *Stroke*. 2009;40(3):994-1025.
67. Ducros A, Boussier MG. Thunderclap headache. *Bmj*. 2013;346:e8557.
68. McCarron MO, Alberts MJ, McCarron P. A systematic review of Terson's syndrome: frequency and prognosis after subarachnoid haemorrhage. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. 2004;75(3):491-493.
69. Rheinboldt M, Francis K, Parrish D, Harper D, Blase J. Terson syndrome in conjunction with ruptured intracranial aneurysm and penetrating intracranial injury: a review of two cases. *Emergency Radiology*. 2014;21(2):215-218.
70. Silverman IE, Restrepo L, Mathews GC. Poststroke seizures. *Archives of Neurology*. 2002;59(2):195-201.
71. Hijdra A, Braakman R, van Gijn J, Vermeulen M, van Crevel H. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Complications and outcome in a hospital population. *Stroke*. 1987;18(6):1061-1067.
72. Jakobsson KE, Saveland H, Hillman J, et al. Warning leak and management outcome in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 1996;85(6):995-999.
73. Linn FH, Wijdicks EF, van der Graaf Y, Weerdesteyn-van Vliet FA, Bartelds AI, van Gijn J. Prospective study of sentinel headache in aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Lancet*. 1994;344(8922):590-593.
74. Tolias CM, Choksey MS. Will increased awareness among physicians of the significance of sudden agonizing headache affect the outcome of subarachnoid hemorrhage? Coventry and Warwickshire Study: audit of subarachnoid hemorrhage (establishing historical controls), hypothesis, campaign layout, and cost estimation. *Stroke*. 1996;27(5):807-812.
75. Hijdra A, van Gijn J, Nagelkerke NJ, Vermeulen M, van Crevel H. Prediction of delayed cerebral ischemia, rebleeding, and outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 1988;19(10):1250-1256.
76. Rosengart AJ, Schultheiss KE, Tolentino J, Macdonald RL. Prognostic factors for outcome in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2007;38(8):2315-2321.
77. Suarez JI, Tarr RW, Selman WR. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *The New England Journal of Medicine*. 2006;354(4):387-396.
78. Hunt WE, Hess RM. Surgical risk as related to time of intervention in the repair of intracranial aneurysms. *J Neurosurg*. 1968;28(1):14-20.

79. Rosen DS, Macdonald RL. Subarachnoid hemorrhage grading scales: a systematic review. *Neurocritical Care*. 2005;2(2):110-118.
80. Wood MJ, Nowitzke AM. Epidemiological aspects of spontaneous subarachnoid haemorrhage in Queensland, Australia. *Journal of Clinical Neuroscience* 2005;12(7):770-774.
81. Degen LA, Dorhout Mees SM, Algra A, Rinkel GJ. Interobserver variability of grading scales for aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2011;42(6):1546-1549.
82. Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet*. 1974;2(7872):81-84.
83. Report of World Federation of Neurological Surgeons Committee on a Universal Subarachnoid Hemorrhage Grading Scale. *Journal of Neurosurgery*. 1988;68(6):985-986.
84. Takagi K, Tamura A, Nakagomi T, et al. How should a subarachnoid hemorrhage grading scale be determined? A combinatorial approach based solely on the Glasgow Coma Scale. *Journal of Neurosurgery*. 1999;90(4):680-687.
85. van Heuven AW, Dorhout Mees SM, Algra A, Rinkel GJ. Validation of a prognostic subarachnoid hemorrhage grading scale derived directly from the Glasgow Coma Scale. *Stroke*. 2008;39(4):1347-1348.
86. Fisher CM, Kistler JP, Davis JM. Relation of cerebral vasospasm to subarachnoid hemorrhage visualized by computerized tomographic scanning. *Neurosurgery*. 1980;6(1):1-9.
87. Klimo P, Jr., Schmidt RH. Computed tomography grading schemes used to predict cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a historical review. *Neurosurgical Focus*. 2006;21(3):E5.
88. Frontera JA, Claassen J, Schmidt JM, et al. Prediction of symptomatic vasospasm after subarachnoid hemorrhage: the modified fisher scale. *Neurosurgery*. 2006;59(1):21-27.
89. Fiebach JB, Schellinger PD, Gass A, et al. Stroke magnetic resonance imaging is accurate in hyperacute intracerebral hemorrhage: a multicenter study on the validity of stroke imaging. *Stroke*. 2004;35(2):502-506.
90. van Gijn J. Slip-ups in diagnosis of subarachnoid haemorrhage. *Lancet*. 1997;349(9064):1492.

91. Czuczman AD, Thomas LE, Boulanger AB, et al. Interpreting red blood cells in lumbar puncture: distinguishing true subarachnoid hemorrhage from traumatic tap. *Journal of Emergency Medicine*. 2013;20(3):247-256.
92. Shah KH, Edlow JA. Distinguishing traumatic lumbar puncture from true subarachnoid hemorrhage. *The Journal of Emergency Medicine*. 2002;23(1):67-74.
93. Lubicz B, Levivier M, Francois O, et al. Sixty-four-row multisection CT angiography for detection and evaluation of ruptured intracranial aneurysms: interobserver and intertechnique reproducibility. *AJNR. American Journal of Neuroradiology*. 2007;28(10):1949-1955.
94. Romijn M, Gratama van Andel HA, van Walderveen MA, et al. Diagnostic accuracy of CT angiography with matched mask bone elimination for detection of intracranial aneurysms: comparison with digital subtraction angiography and 3D rotational angiography. *AJNR. American Journal of Neuroradiology*. 2008;29(1):134-139.
95. Boogaarts HD, van Amerongen MJ, de Vries J, et al. Caseload as a factor for outcome in aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurosurgery*. 2014;120(3):605-611.
96. Green DM, Burns JD, DeFusco CM. ICU management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Journal of Intensive Care Medicine*. 2013;28(6):341-354.
97. Ohkuma H, Tsurutani H, Suzuki S. Incidence and significance of early aneurysmal rebleeding before neurosurgical or neurological management. *Stroke*. 2001;32(5):1176-1180.
98. Kim SY, Kim SM, Park MS, Kim HK, Park KS, Chung SY. Effectiveness of nicardipine for blood pressure control in patients with subarachnoid hemorrhage. *Journal of Cerebrovascular and Endovascular Neurosurgery*. 2012;14(2):84-89.
99. Cannon CM, Levy P, Baumann BM, et al. Intravenous nicardipine and labetalol use in hypertensive patients with signs or symptoms suggestive of end-organ damage in the emergency department: a subgroup analysis of the CLUE trial. *BMJ Open*. 2013;3(3).
100. Wartenberg KE, Schmidt JM, Claassen J, et al. Impact of medical complications on outcome after subarachnoid hemorrhage. *Critical Care Medicine*. 2006;34(3):617-623.
101. Dorhout Mees SM, van Dijk GW, Algra A, Kempink DR, Rinkel GJ. Glucose levels and outcome after subarachnoid hemorrhage. *Neurology*. 2003;61(8):1132-1133.

102. Lanzino G, Kassell NF, Germanson T, Truskowski L, Alves W. Plasma glucose levels and outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Journal of Neurosurgery*. 1993;79(6):885-891.
103. Juvela S, Siironen J, Kuhmonen J. Hyperglycemia, excess weight, and history of hypertension as risk factors for poor outcome and cerebral infarction after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Journal of Neurosurgery*. 2005;102(6):998-1003.
104. Dorhout Mees SM, Luitse MJ, van den Bergh WM, Rinkel GJ. Fever after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: relation with extent of hydrocephalus and amount of extravasated blood. *Stroke*. 2008;39(7):2141-2143.
105. Siasios I, Kapsalaki EZ, Fountas KN. Cerebral vasospasm pharmacological treatment: an update. *Neurology Research International*. 2013;2013:571328.
106. Rinkel GJ, Feigin VL, Algra A, van den Bergh WM, Vermeulen M, van Gijn J. Calcium antagonists for aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2005(1):CD000277.
107. Dorhout Mees SM, Rinkel GJ, Feigin VL, et al. Calcium antagonists for aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2007(3):CD000277.
108. Ott S, Jedlicka S, Wolf S, et al. Continuous selective intra-arterial application of nimodipine in refractory cerebral vasospasm due to aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *BioMed Research International*. 2014;2014:970741.
109. Reddy D, Fallah A, Petropoulos JA, Farrokhyar F, Macdonald RL, Jichici D. Prophylactic Magnesium Sulfate for Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: A Systematic Review and Meta-analysis. *Neurocritical Care*. 2014;21(2):356-364
110. Guglielmi G, Vinuela F, Dion J, Duckwiler G. Electrothrombosis of saccular aneurysms via endovascular approach. Part 2: Preliminary clinical experience. *J Neurosurg*. 1991;75(1):8-14.
111. Whitfield PC, Kirkpatrick PJ. Timing of surgery for aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2001(2):CD001697.
112. Mayberg MR, Batjer HH, Dacey R, et al. Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. A statement for healthcare professionals from a special writing group of the Stroke Council, American Heart Association. *Stroke*. 1994;25(11):2315-2328.
113. Molyneux A, Kerr R, Stratton I, et al. International Subarachnoid Aneurysm Trial (ISAT) of neurosurgical clipping versus endovascular coiling in 2143 patients with ruptured intracranial aneurysms: a randomised trial. *Lancet*. 2002;360(9342):1267-1274.

114. Molyneux AJ, Kerr RS, Yu LM, et al. International subarachnoid aneurysm trial (ISAT) of neurosurgical clipping versus endovascular coiling in 2143 patients with ruptured intracranial aneurysms: a randomised comparison of effects on survival, dependency, seizures, rebleeding, subgroups, and aneurysm occlusion. *Lancet*. 2005;366(9488):809-817.
115. Britz GW. ISAT trial: coiling or clipping for intracranial aneurysms? *Lancet*. 2005;366(9488):783-785.
116. Kim DJ, Czosnyka Z, Kasprowicz M, et al. Continuous monitoring of the Monro-Kellie doctrine: is it possible? *Journal of Neurotrauma*. 2012;29(7):1354-1363.
117. Bailes JE, Spetzler RF, Hadley MN, Baldwin HZ. Management morbidity and mortality of poor-grade aneurysm patients. *J Neurosurg*. 1990;72(4):559-566.
118. Jakobsen M, Enevoldsen E, Bjerre P. Cerebral blood flow and metabolism following subarachnoid haemorrhage: cerebral oxygen uptake and global blood flow during the acute period in patients with SAH. *Acta Neurologica Scandinavica*. 1990;82(3):174-182.
119. Nornes H. The role of intracranial pressure in the arrest of hemorrhage in patients with ruptured intracranial aneurysm. *J Neurosurg*. 1973;39(2):226-234.
120. Nornes H. Cerebral arterial flow dynamics during aneurysm haemorrhage. *Acta Neurochirurgica*. 1978;41(1-3):39-48.
121. Grote E, Hassler W. The critical first minutes after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 1988;22(4):654-661.
122. Kassell NF, Torner JC, Haley EC, Jr., Jane JA, Adams HP, Kongable GL. The International Cooperative Study on the Timing of Aneurysm Surgery. Part 1: Overall management results. *Journal of Neurosurgery*. 1990;73(1):18-36.
123. Raslan A, Bhardwaj A. Medical management of cerebral edema. *Neurosurgical Focus*. 2007;22(5):E12.
124. Crompton MR. The Pathogenesis of Cerebral Infarction Following the Rupture of Cerebral Berry Aneurysms. *Brain. Journal of Neurology*. 1964;87:491-510.
125. Wijdicks EF, Vermeulen M, Murray GD, Hijdra A, van Gijn J. The effects of treating hypertension following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Clinical Neurology and Neurosurgery*. 1990;92(2):111-117.
126. Neil-Dwyer G, Lang DA, Doshi B, Gerber CJ, Smith PW. Delayed cerebral ischaemia: the pathological substrate. *Acta Neurochirurgica*. 1994;131(1-2):137-145.

127. Feiler S, Friedrich B, Scholler K, Thal SC, Plesnila N. Standardized induction of subarachnoid hemorrhage in mice by intracranial pressure monitoring. *Journal of Neuroscience Methods*. 2010;190(2):164-170.
128. Jakubowski J, Bell BA, Symon L, Zawirski MB, Francis DM. A primate model of subarachnoid hemorrhage: change in regional cerebral blood flow, autoregulation carbon dioxide reactivity, and central conduction time. *Stroke*. 1982;13(5):601-611.
129. Piepgras A, Thome C, Schmiedek P. Characterization of an anterior circulation rat subarachnoid hemorrhage model. *Stroke*. 1995;26(12):2347-2352.
130. Bederson JB, Germano IM, Guarino L. Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the rat. *Stroke*. 1995;26(6):1086-1091.
131. Rasmussen G, Hauerberg J, Waldemar G, Gjerris F, Juhler M. Cerebral blood flow autoregulation in experimental subarachnoid haemorrhage in rat. *Acta Neurochirurgica*. 1992;119(1-4):128-133.
132. Sehba FA, Pluta RM, Zhang JH. Metamorphosis of subarachnoid hemorrhage research: from delayed vasospasm to early brain injury. *Molecular Neurobiology*. 2011;43(1):27-40.
133. Cossu G, Messerer M, Oddo M, Daniel RT. To look beyond vasospasm in aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *BioMed Research International*. 2014;2014:628597.
134. Friedrich V, Flores R, Muller A, Sehba FA. Escape of intraluminal platelets into brain parenchyma after subarachnoid hemorrhage. *Neuroscience*. 2010;165(3):968-975.
135. Stein SC, Browne KD, Chen XH, Smith DH, Graham DI. Thromboembolism and delayed cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage: an autopsy study. *Neurosurgery*. 2006;59(4):781-787.
136. Nau R, Haase S, Bunkowski S, Bruck W. Neuronal apoptosis in the dentate gyrus in humans with subarachnoid hemorrhage and cerebral hypoxia. *Brain Pathology*. 2002;12(3):329-336.
137. Sehba FA, Friedrich V, Jr., Makonnen G, Bederson JB. Acute cerebral vascular injury after subarachnoid hemorrhage and its prevention by administration of a nitric oxide donor. *Journal of Neurosurgery*. 2007;106(2):321-329.
138. Sehba FA, Mostafa G, Knopman J, Friedrich V, Jr., Bederson JB. Acute alterations in microvascular basal lamina after subarachnoid hemorrhage. *Journal of Neurosurgery*. 2004;101(4):633-640.

139. Friedrich V, Flores R, Muller A, Sehba FA. Luminal platelet aggregates in functional deficits in parenchymal vessels after subarachnoid hemorrhage. *Brain Research*. 2010;1354:179-187.
140. Sehba FA, Ding WH, Chereshev I, Bederson JB. Effects of S-nitrosoglutathione on acute vasoconstriction and glutamate release after subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 1999;30(9):1955-1961.
141. Milhorat TH. Acute hydrocephalus after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 1987;20(1):15-20.
142. Kamiya K, Kuyama H, Symon L. An experimental study of the acute stage of subarachnoid hemorrhage. *Journal of Neurosurgery*. 1983;59(6):917-924.
143. Sehba FA, Schwartz AY, Chereshev I, Bederson JB. Acute decrease in cerebral nitric oxide levels after subarachnoid hemorrhage. *Journal Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2000;20(3):604-611.
144. Sehba FA, Mostafa G, Friedrich V, Jr., Bederson JB. Acute microvascular platelet aggregation after subarachnoid hemorrhage. *Journal of Neurosurgery*. 2005;102(6):1094-1100.
145. Josko J, Hendryk S, Jedrzejowska-Szypula H, Gwozdz B, Herman ZS, Gawlik R. Influence endothelin ETA receptor antagonist--BQ-123--on changes of endothelin-1 level in plasma of rats with acute vasospasm following subarachnoid hemorrhage. *Journal of physiology and pharmacology. Journal of the Polish Physiological Society*. 1998;49(3):367-375.
146. Gaetani P, Marzatico F, Rodriguez y Baena R, et al. Arachidonic acid metabolism and pathophysiologic aspects of subarachnoid hemorrhage in rats. *Stroke*. 1990;21(2):328-332.
147. Marzatico F, Gaetani P, Cafe C, Spanu G, Rodriguez y Baena R. Antioxidant enzymatic activities after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Acta Neurologica Scandinavica*. 1993;87(1):62-66.
148. Macdonald RL. Delayed neurological deterioration after subarachnoid haemorrhage. *Nature reviews. Neurology*. 2014;10(1):44-58.
149. Dorsch NW. A review of cerebral vasospasm in aneurysmal subarachnoid haemorrhage Part II: Management. *Journal of clinical neuroscience. Journal Neurosurgical Society of Australasia*. 1994;1(2):78-92.
150. Robertson EG. Cerebral lesions due to intracranial aneurysms. *Brain : Journal of Neurology*. 1949;72(Pt. 2):150-185.
151. Ecker A, Riemenschneider PA. Arteriographic demonstration of spasm of the intracranial arteries, with special reference to saccular arterial aneurysms. *J Neurosurg*. 1951;8(6):660-667.

152. Kassell NF, Sasaki T, Colohan AR, Nazar G. Cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 1985;16(4):562-572.
153. Weir B. The pathophysiology of cerebral vasospasm. *British Journal of Neurosurgery*. 1995;9(3):375-390.
154. Maeda K, Kurita H, Nakamura T, et al. Occurrence of severe vasospasm following intraventricular hemorrhage from an arteriovenous malformation. Report of two cases. *Journal of Neurosurgery*. 1997;87(3):436-439.
155. Carvi y Nievas MN, Archavlis E. Atypical causes of nontraumatic intracranial subarachnoid hemorrhage. *Clinical Neurology and Neurosurgery*. 2009;111(4):354-358.
156. Martin NA, Doberstein C, Zane C, Caron MJ, Thomas K, Becker DP. Posttraumatic cerebral arterial spasm: transcranial Doppler ultrasound, cerebral blood flow, and angiographic findings. *Journal of Neurosurgery*. 1992;77(4):575-583.
157. Raps EC, Galetta SL, Broderick M, Atlas SW. Delayed peripartum vasculopathy: cerebral eclampsia revisited. *Annals of Neurology*. 1993;33(2):222-225.
158. Wilkins RH. Cerebral vasospasm. *Critical Reviews in Neurobiology*. 1990;6(1):51-77.
159. Aaslid R, Markwalder TM, Nornes H. Noninvasive transcranial Doppler ultrasound recording of flow velocity in basal cerebral arteries. *J Neurosurg*. 1982;57(6):769-774.
160. Takeuchi K, Miyata N, Renic M, Harder DR, Roman RJ. Hemoglobin, NO, and 20-HETE interactions in mediating cerebral vasoconstriction following SAH. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2006;290(1):R84-89.
161. Zimmermann M, Seifert V. Endothelin and subarachnoid hemorrhage: an overview. *Neurosurgery*. 1998;43(4):863-875.
162. Vergouwen MD, Ilodigwe D, Macdonald RL. Cerebral infarction after subarachnoid hemorrhage contributes to poor outcome by vasospasm-dependent and -independent effects. *Stroke*. 2011;42(4):924-929.
163. Treggiari-Venzi MM, Suter PM, Romand JA. Review of medical prevention of vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a problem of neurointensive care. *Neurosurgery*. 2001;48(2):249-261.
164. Fergusen S, Macdonald RL. Predictors of cerebral infarction in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 2007;60(4):658-667.

165. Jakobsen M, Enevoldsen E, Dalager T. Spasm index in subarachnoid haemorrhage: consequences of vasospasm upon cerebral blood flow and oxygen extraction. *Acta Neurologica Scandinavica*. 1990;82(5):311-320.
166. Weir B, Grace M, Hansen J, Rothberg C. Time course of vasospasm in man. *J Neurosurg*. 1978;48(2):173-178.
167. Castanares-Zapatero D, Hantson P. Pharmacological treatment of delayed cerebral ischemia and vasospasm in subarachnoid hemorrhage. *Annals of Intensive Care*. 2011;1(1):12.
168. Leng LZ, Fink ME, Iadecola C. Spreading depolarization: a possible new culprit in the delayed cerebral ischemia of subarachnoid hemorrhage. *Archives of Neurology*. 2011;68(1):31-36.
169. Dreier JP. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nature Medicine*. 2011;17(4):439-447.
170. Edvinsson L, Povlsen GK. Late cerebral ischaemia after subarachnoid haemorrhage: is cerebrovascular receptor upregulation the mechanism behind? *Acta Physiologica*. 2011;203(1):209-224.
171. Muroi C, Mink S, Seule M, Bellut D, Fandino J, Keller E. Monitoring of the inflammatory response after aneurysmal subarachnoid haemorrhage in the clinical setting: review of literature and report of preliminary clinical experience. *Acta Neurochirurgica. Supplement*. 2011;110(Pt 1):191-196.
172. Nakura T, Osuka K, Inukai T, Takagi T, Takayasu M. Soluble gp130 regulates interleukin-6 in cerebrospinal fluid after subarachnoid haemorrhage. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. 2011;82(9):952-954.
173. Sarrafzadeh A, Schlenk F, Gericke C, Vajkoczy P. Relevance of cerebral interleukin-6 after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurocritical Care*. 2010;13(3):339-346.
174. Rabinstein AA, Lanzino G, Wijdicks EF. Multidisciplinary management and emerging therapeutic strategies in aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *The Lancet. Neurology*. 2010;9(5):504-519.
175. Crowley RW, Medel R, Dumont AS, et al. Angiographic vasospasm is strongly correlated with cerebral infarction after subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2011;42(4):919-923.
176. Dorsch NW. Cerebral arterial spasm--a clinical review. *British Journal of Neurosurgery*. 1995;9(3):403-412.

177. Macdonald RL, Higashida RT, Keller E, et al. Randomised trial of clazosentan, an endothelin receptor antagonist, in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage undergoing surgical clipping (CONSCIOUS-2). *Acta Neurochirurgica. Supplement.* 2013;115:27-31.
178. Macdonald RL, Higashida RT, Keller E, et al. Clazosentan, an endothelin receptor antagonist, in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage undergoing surgical clipping: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial (CONSCIOUS-2). *The Lancet. Neurology.* 2011;10(7):618-625.
179. Schubert GA, Seiz M, Hegewald AA, Manville J, Thome C. Acute hypoperfusion immediately after subarachnoid hemorrhage: a xenon contrast-enhanced CT study. *Journal of Neurotrauma.* 2009;26(12):2225-2231.
180. Schubert GA, Seiz M, Hegewald AA, Manville J, Thome C. Hypoperfusion in the acute phase of subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochirurgica. Supplement.* 2011;110(Pt 1):35-38.
181. Herz DA, Baez S, Shulman K. Pial microcirculation in subarachnoid hemorrhage. *Stroke.* 1975;6(4):417-424.
182. Uhl E, Lehmberg J, Steiger HJ, Messmer K. Intraoperative detection of early microvasospasm in patients with subarachnoid hemorrhage by using orthogonal polarization spectral imaging. *Neurosurgery.* 2003;52(6):1307-1315.
183. Pennings FA, Bouma GJ, Ince C. Direct observation of the human cerebral microcirculation during aneurysm surgery reveals increased arteriolar contractility. *Stroke.* 2004;35(6):1284-1288.
184. Friedrich B, Muller F, Feiler S, Scholler K, Plesnila N. Experimental subarachnoid hemorrhage causes early and long-lasting microarterial constriction and microthrombosis: an in-vivo microscopy study. *Journal Cerebral Blood Flow and Metabolism.* 2012;32(3):447-455.
185. Stamler JS. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell.* 1994;78(6):931-936.
186. Beligni MV, Lamattina L. Nitric oxide: a non-traditional regulator of plant growth. *Trends in plant Science.* 2001;6(11):508-509.
187. Ignarro LJ. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 1990;30:535-560.
188. Anbar M. Nitric oxide: a synchronizing chemical messenger. *Experientia.* 1995;51(6):545-550.
189. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1987;84(24):9265-9269.
- 190.** Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987;327(6122):524-526.
- 191.** Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373-376.
- 192.** Hanbauer I, Wink D, Osawa Y, Edelman GM, Gally JA. Role of nitric oxide in NMDA-evoked release of [3H]-dopamine from striatal slices. *Neuroreport*. 1992;3(5):409-412.
- 193.** Ridnour LA, Windhausen AN, Isenberg JS, et al. Nitric oxide regulates matrix metalloproteinase-9 activity by guanylyl-cyclase-dependent and -independent pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(43):16898-16903.
- 194.** Brecht DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annual Review of Biochemistry*. 1994;63:175-195.
- 195.** Vincent SR. Nitric oxide neurons and neurotransmission. *Progress in Neurobiology*. 2010;90(2):246-255.
- 196.** Paul V, Ekambaram P. Involvement of nitric oxide in learning & memory processes. *The Indian Journal of Medical Research*. 2011;133:471-478.
- 197.** Buerk DG, Barbee KA, Jaron D. Nitric oxide signaling in the microcirculation. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*. 2011;39(5):397-433.
- 198.** Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *The Biochemical Journal*. 2001;357(Pt 3):593-615.
- 199.** McCarron RM, Chen Y, Tomori T, et al. Endothelial-mediated regulation of cerebral microcirculation. *Journal of physiology and pharmacology. Journal of the Polish Physiological Society*. 2006;57 Suppl 11:133-144.
- 200.** Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*. 2006;113(13):1708-1714.
- 201.** Yamakawa H, Jezova M, Ando H, Saavedra JM. Normalization of endothelial and inducible nitric oxide synthase expression in brain microvessels of spontaneously hypertensive rats by angiotensin II AT1 receptor inhibition. *Journal Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2003;23(3):371-380.

202. Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM, Herman AG. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature*. 1990;345(6273):346-347.
203. Estrada C, Mengual E, Gonzalez C. Local NADPH-diaphorase neurons innervate pial arteries and lie close or project to intracerebral blood vessels: a possible role for nitric oxide in the regulation of cerebral blood flow. *Journal Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 1993;13(6):978-984.
204. Iadecola C, Beitz AJ, Renno W, Xu X, Mayer B, Zhang F. Nitric oxide synthase-containing neural processes on large cerebral arteries and cerebral microvessels. *Brain Research*. 1993;606(1):148-155.
205. Iadecola C, Zhang F, Casey R, Clark HB, Ross ME. Inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular cells after transient focal cerebral ischemia. *Stroke*. 1996;27(8):1373-1380.
206. Forster C, Clark HB, Ross ME, Iadecola C. Inducible nitric oxide synthase expression in human cerebral infarcts. *Acta Neuropathologica*. 1999;97(3):215-220.
207. Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977;74(8):3203-3207.
208. Evgenov OV, Pacher P, Schmidt PM, Hasko G, Schmidt HH, Stasch JP. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nature Reviews. Drug Discovery*. 2006;5(9):755-768.
209. Fischmann TO, Hruza A, Niu XD, et al. Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation. *Nature Structural Biology*. 1999;6(3):233-242.
210. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *The Journal of Biological Chemistry*. 1993;268(23):17478-17488.
211. Forstermann U, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M, Murad F. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(5):1788-1792.
212. Abe K, Pan LH, Watanabe M, Konno H, Kato T, Itoyama Y. Upregulation of protein-tyrosine nitration in the anterior horn cells of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurological Research*. 1997;19(2):124-128.

- 213. Colasanti M, Persichini T, Fabrizi C, et al. Expression of a NOS-III-like protein in human astroglial cell culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1998;252(3):552-555.
- 214. Iwase K, Miyanaka K, Shimizu A, et al. Induction of endothelial nitric-oxide synthase in rat brain astrocytes by systemic lipopolysaccharide treatment. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(16):11929-11933.
- 215. Reiling N, Kroncke R, Ulmer AJ, Gerdes J, Flad HD, Hauschildt S. Nitric oxide synthase: expression of the endothelial, Ca²⁺/calmodulin-dependent isoform in human B and T lymphocytes. *European Journal of Immunology*. 1996;26(3):511-516.
- 216. Helfrich MH, Evans DE, Grabowski PS, Pollock JS, Ohshima H, Ralston SH. Expression of nitric oxide synthase isoforms in bone and bone cell cultures. *Journal of bone and mineral research. Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1997;12(7):1108-1115.
- 217. Wang R, Ghahary A, Shen YJ, Scott PG, Tredget EE. Human dermal fibroblasts produce nitric oxide and express both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms. *The Journal of Investigative Dermatology*. 1996;106(3):419-427.
- 218. Balligand JL, Kobzik L, Han X, et al. Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(24):14582-14586.
- 219. Zimmermann H, Kurzen P, Klossner W, Renner EL, Marti U. Decreased constitutive hepatic nitric oxide synthase expression in secondary biliary fibrosis and its changes after Roux-en-Y choledocho-jejunostomy in the rat. *Journal of Hepatology*. 1996;25(4):567-573.
- 220. Xue C, Pollock J, Schmidt HH, Ward SM, Sanders KM. Expression of nitric oxide synthase immunoreactivity by interstitial cells of the canine proximal colon. *Journal of the Autonomic Nervous System*. 1994;49(1):1-14.
- 221. Church JE, Fulton D. Differences in eNOS activity because of subcellular localization are dictated by phosphorylation state rather than the local calcium environment. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(3):1477-1488.
- 222. Hoffmann A, Gloe T, Pohl U. Hypoxia-induced upregulation of eNOS gene expression is redox-sensitive: a comparison between hypoxia and inhibitors of cell metabolism. *Journal of Cellular Physiology*. 2001;188(1):33-44.
- 223. Le Cras TD, Xue C, Rengasamy A, Johns RA. Chronic hypoxia upregulates endothelial and inducible NO synthase gene and protein expression in rat lung. *The American Journal of Physiology*. 1996;270(1 Pt 1):L164-170.

224. Uematsu M, Ohara Y, Navas JP, et al. Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *The American Journal of Physiology*. 1995;269(6 Pt 1):C1371-1378.
225. Malek AM, Izumo S, Alper SL. Modulation by pathophysiological stimuli of the shear stress-induced up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression in endothelial cells. *Neurosurgery*. 1999;45(2):334-344.
226. Ruehlmann DO, Mann GE. Rapid non-genomic vasodilator actions of oestrogens and sex steroids. *Current Medicinal Chemistry*. 2000;7(5):533-541.
227. Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circulation Research*. 2001;88(8):756-762.
228. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *The New England Journal of Medicine*. 1993;329(27):2002-2012.
229. Thomas DD, Ridnour LA, Isenberg JS, et al. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radical Biology & Medicine*. 2008;45(1):18-31.
230. Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet*. 1994;343(8907):1199-1206.
231. Hall AV, Antoniou H, Wang Y, et al. Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1). *The Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(52):33082-33090.
232. Ohkuma H, Itoh K, Shibata S, Suzuki S. Morphological changes of intraparenchymal arterioles after experimental subarachnoid hemorrhage in dogs. *Neurosurgery*. 1997;41(1):230-235.
233. Vincent SR, Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*. 1992;46(4):755-784.
234. Reuss S, Decker K, Rosseler L, Layes E, Schollmayer A, Spessert R. Nitric oxide synthase in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: evidence from histochemistry, immunohistochemistry and western blot; and colocalization with VIP. *Brain Research*. 1995;695(2):257-262.
235. Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*. 1990;347(6295):768-770.
236. Cabrera C, Bohr D. The role of nitric oxide in the central control of blood pressure. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1995;206(1):77-81.
237. Yun HY, Dawson VL, Dawson TM. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Molecular Psychiatry*. 1997;2(4):300-310.

- 238.** Kagiya S, Tsuchihashi T, Abe I, Fujishima M. Enhanced depressor response to nitric oxide in the rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1998;31(4):1030-1034.
- 239.** Spyer KM. Annual review prize lecture. Central nervous mechanisms contributing to cardiovascular control. *The Journal of Physiology*. 1994;474(1):1-19.
- 240.** Tedeschi E, Menegazzi M, Margotto D, Suzuki H, Forstermann U, Kleinert H. Anti-inflammatory actions of St. John's wort: inhibition of human inducible nitric-oxide synthase expression by down-regulating signal transducer and activator of transcription-1alpha (STAT-1alpha) activation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2003;307(1):254-261.
- 241.** Cho HJ, Xie QW, Calaycay J, et al. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*. 1992;176(2):599-604.
- 242.** Guo FH, De Raeve HR, Rice TW, Stuehr DJ, Thunnissen FB, Erzurum SC. Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(17):7809-7813.
- 243.** Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology*. 2001;2(10):907-916.
- 244.** Lyons CR, Orloff GJ, Cunningham JM. Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *The Journal of Biological Chemistry*. 1992;267(9):6370-6374.
- 245.** Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, et al. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*. 1992;256(5054):225-228.
- 246.** Moncada S. Nitric oxide gas: mediator, modulator, and pathophysiologic entity. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1992;120(2):187-191.
- 247.** Hibbs JB, Jr., Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1988;157(1):87-94.
- 248.** Fang FC. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *The Journal of Clinical Investigation*. 1997;99(12):2818-2825.
- 249.** Mattson DL, Maeda CY, Bachman TD, Cowley AW, Jr. Inducible nitric oxide synthase and blood pressure. *Hypertension*. 1998;31(1):15-20.

- 250. Rubinstein I, Abassi Z, Coleman R, Milman F, Winaver J, Better OS. Involvement of nitric oxide system in experimental muscle crush injury. *The Journal of Clinical Investigation*. 1998;101(6):1325-1333.
- 251. Mashimo H, Goyal RK. Lessons from genetically engineered animal models. IV. Nitric oxide synthase gene knockout mice. *The American Journal of Physiology*. 1999;277(4 Pt 1):G745-750.
- 252. Kolb H, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide in autoimmune disease: cytotoxic or regulatory mediator? *Immunology Today*. 1998;19(12):556-561.
- 253. Garry PS, Ezra M, Rowland MJ, Westbrook J, Pattinson KT. The role of the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment--from bench to bedside. *Experimental Neurology*. 2015;263:235-243.
- 254. Toda N, Ayajiki K, Okamura T. Cerebral blood flow regulation by nitric oxide in neurological disorders. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2009;87(8):581-594.
- 255. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews*. 1991;43(2):109-142.
- 256. Broos K, Feys HB, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Reviews*. 2011;25(4):155-167.
- 257. Schuman EM, Madison DV. Nitric oxide and synaptic function. *Annual Review of Neuroscience*. 1994;17:153-183.
- 258. Toda N, Okamura T. The pharmacology of nitric oxide in the peripheral nervous system of blood vessels. *Pharmacological Reviews*. 2003;55(2):271-324.
- 259. Marletta MA. Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide, and N-nitrosating agents. *Chemical Research in Toxicology*. 1988;1(5):249-257.
- 260. Pautz A, Art J, Hahn S, Nowag S, Voss C, Kleinert H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric oxide : biology and chemistry / Journal of the Nitric Oxide Society*. 2010;23(2):75-93.
- 261. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology*. 1997;15:323-350.
- 262. Schwartz AY, Sehba FA, Bederson JB. Decreased nitric oxide availability contributes to acute cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 2000;47(1):208-214.
- 263. Sehba FA, Cheresnev I, Maayani S, Friedrich V, Jr., Bederson JB. Nitric oxide synthase in acute alteration of nitric oxide levels after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 2004;55(3):671-677

- 264.** Afshar JK, Pluta RM, Boock RJ, Thompson BG, Oldfield EH. Effect of intracarotid nitric oxide on primate cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg.* 1995;83(1):118-122.
- 265.** Kajita Y, Suzuki Y, Oyama H, et al. Combined effect of L-arginine and superoxide dismutase on the spastic basilar artery after subarachnoid hemorrhage in dogs. *J Neurosurg.* 1994;80(3):476-483.
- 266.** Watkins LD. Nitric oxide and cerebral blood flow: an update. *Cerebrovascular and Brain Metabolism Reviews.* 1995;7(4):324-337.
- 267.** Sobey CG, Faraci FM. Subarachnoid haemorrhage: what happens to the cerebral arteries? *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology.* 1998;25(11):867-876.
- 268.** Pluta RM. Delayed cerebral vasospasm and nitric oxide: review, new hypothesis, and proposed treatment. *Pharmacology & Therapeutics.* 2005;105(1):23-56.
- 269.** Hlatky R, Goodman JC, Valadka AB, Robertson CS. Role of nitric oxide in cerebral blood flow abnormalities after traumatic brain injury. *Journal Cerebral Blood Flow and Metabolism.* 2003;23(5):582-588.
- 270.** Terpolilli NA, Kim SW, Thal SC, et al. Inhalation of nitric oxide prevents ischemic brain damage in experimental stroke by selective dilatation of collateral arterioles. *Circulation Research.* 2012;110(5):727-738.
- 271.** Miller MR, Megson IL. Recent developments in nitric oxide donor drugs. *British Journal of Pharmacology.* 2007;151(3):305-321.
- 272.** Fathi AR, Bakhtian KD, Pluta RM. The role of nitric oxide donors in treating cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochirurgica. Supplement.* 2011;110(Pt 1):93-97.
- 273.** Scatena R, Bottoni P, Pontoglio A, Giardina B. Pharmacological modulation of nitric oxide release: new pharmacological perspectives, potential benefits and risks. *Current Medicinal Chemistry.* 2010;17(1):61-73.
- 274.** Allen GS, Gross CJ. Cerebral arterial spasm. Part 7: In vitro effects of alpha adrenergic agents on canine arteries from six anatomical sites and six blocking agents on serotonin-induced contractions of the canine basilar artery. *Surgical Neurology.* 1976;6(2):63-70.
- 275.** Allen GS. Cerebral arterial spasm. Part 8: The treatment of delayed cerebral arterial spasm in human beings. *Surgical Neurology.* 1976;6(2):71-80.
- 276.** Ram Z, Spiegelman R, Findler G, Hadani M. Delayed postoperative neurological deterioration from prolonged sodium nitroprusside administration. Case report. *Journal of Neurosurgery.* 1989;71(4):605-607.

- 277.** Nakao K, Murata H, Kanamaru K, Waga S. Effects of nitroglycerin on vasospasm and cyclic nucleotides in a primate model of subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 1996;27(10):1882-1887.
- 278.** Reinert M, Wiest R, Barth L, Andres R, Ozdoba C, Seiler R. Transdermal nitroglycerin in patients with subarachnoid hemorrhage. *Neurological Research*. 2004;26(4):435-439.
- 279.** Tanaka Y, Masuzawa T, Saito M, et al. Combined administration of Fasudil hydrochloride and nitroglycerin for treatment of cerebral vasospasm. *Acta Neurochirurgica. Supplement*. 2001;77:205-207.
- 280.** Marbacher S, Neuschmelting V, Graupner T, Jakob SM, Fandino J. Prevention of delayed cerebral vasospasm by continuous intrathecal infusion of glyceroltrinitrate and nimodipine in the rabbit model in vivo. *Intensive Care Medicine*. 2008;34(5):932-938.
- 281.** Pluta RM, Oldfield EH, Boock RJ. Reversal and prevention of cerebral vasospasm by intracarotid infusions of nitric oxide donors in a primate model of subarachnoid hemorrhage. *Journal of Neurosurgery*. 1997;87(5):746-751.
- 282.** Clatterbuck RE, Gailloud P, Tierney T, Clatterbuck VM, Murphy KJ, Tamargo RJ. Controlled release of a nitric oxide donor for the prevention of delayed cerebral vasospasm following experimental subarachnoid hemorrhage in nonhuman primates. *Journal of Neurosurgery*. 2005;103(4):745-751.
- 283.** Aihara Y, Jahromi BS, Yassari R, Sayama T, Macdonald RL. Effects of a nitric oxide donor on and correlation of changes in cyclic nucleotide levels with experimental vasospasm. *Neurosurgery*. 2003;52(3):661-667.
- 284.** Keefer LK. Progress toward clinical application of the nitric oxide-releasing diazeniumdiolates. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2003;43:585-607.
- 285.** Giedrojc J, Weichert W, Breddin HK. [Antithrombotic effects of molsidomine alone and in combination with other antithrombotic agents in a thrombosis model of the microcirculation of the rat]. *Zeitschrift für Kardiologie*. 1991;80 Suppl 5:35-39.
- 286.** Oldfield EH, Looma JJ, Monteith SJ, et al. Safety and pharmacokinetics of sodium nitrite in patients with subarachnoid hemorrhage: a phase IIa study. *Journal of Neurosurgery*. 2013;119(3):634-641.
- 287.** Pluta RM, Oldfield EH, Bakhtian KD, et al. Safety and feasibility of long-term intravenous sodium nitrite infusion in healthy volunteers. *PloS One*. 2011;6(1):e14504.

- 288.** Frostell C, Fratacci MD, Wain JC, Jones R, Zapol WM. Inhaled nitric oxide. A selective pulmonary vasodilator reversing hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Circulation*. 1991;83(6):2038-2047.
- 289.** Pepke-Zaba J, Higenbottam TW, Dinh-Xuan AT, Stone D, Wallwork J. Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension. *Lancet*. 1991;338(8776):1173-1174.
- 290.** Ichinose F, Roberts JD, Jr., Zapol WM. Inhaled nitric oxide: a selective pulmonary vasodilator: current uses and therapeutic potential. *Circulation*. 2004;109(25):3106-3111.
- 291.** Peliowski A, Canadian Paediatric Society F, Newborn C. Inhaled nitric oxide use in newborns. *Paediatrics & Child Health*. 2012;17(2):95-100.
- 292.** Finer NN, Barrington KJ. Nitric oxide for respiratory failure in infants born at or near term. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2006(4):CD000399.
- 293.** Bloch KD, Ichinose F, Roberts JD, Jr., Zapol WM. Inhaled NO as a therapeutic agent. *Cardiovascular Research*. 2007;75(2):339-348.
- 294.** Fox-Robichaud A, Payne D, Hasan SU, et al. Inhaled NO as a viable antiadhesive therapy for ischemia/reperfusion injury of distal microvascular beds. *The Journal of Clinical Investigation*. 1998;101(11):2497-2505.
- 295.** Nagasaka Y, Fernandez BO, Garcia-Saura MF, et al. Brief periods of nitric oxide inhalation protect against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology*. 2008;109(4):675-682.
- 296.** Rosenberg AA, Kinsella JP, Abman SH. Cerebral hemodynamics and distribution of left ventricular output during inhalation of nitric oxide. *Critical Care Medicine*. 1995;23(8):1391-1397.
- 297.** Lopes Cardozo RH, de Beaufort AJ, Gesink BJ, et al. Inhalation of nitric oxide: effect on cerebral hemodynamics and activity, and antioxidant status in the newborn lamb. *Biology of the Neonate*. 1996;69(4):284-292.
- 298.** Kusuda S, Shishida N, Miyagi N, Hirabayashi M, Kim TJ. Cerebral blood flow during treatment for pulmonary hypertension. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*. 1999;80(1):F30-33.
- 299.** Vavilala MS, Roberts JS, Moore AE, Newell DW, Lam AM. The influence of inhaled nitric oxide on cerebral blood flow and metabolism in a child with traumatic brain injury. *Anesthesia and Analgesia*. 2001;93(2):351-353 , 353rd contents page.

- 300. Kuebler WM, Kisch-Wedel H, Kemming GI, et al. Inhaled nitric oxide induces cerebrovascular effects in anesthetized pigs. *Neuroscience Letters*. 2003;348(2):85-88.
- 301. Terpolilli NA, Moskowitz MA, Plesnila N. Nitric oxide: considerations for the treatment of ischemic stroke. *Journal Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2012;32(7):1332-1346.
- 302. Paulson OB, Strandgaard S, Edvinsson L. Cerebral autoregulation. *Cerebrovascular and Brain Metabolism Reviews*. 1990;2(2):161-192.
- 303. Ruland S, Aiyagari V. Cerebral autoregulation and blood pressure lowering. *Hypertension*. 2007;49(5):977-978.
- 304. Voldby B, Enevoldsen EM, Jensen FT. Cerebrovascular reactivity in patients with ruptured intracranial aneurysms. *Journal of Neurosurgery*. 1985;62(1):59-67.
- 305. Giller CA. A bedside test for cerebral autoregulation using transcranial Doppler ultrasound. *Acta Neurochirurgica*. 1991;108(1-2):7-14.
- 306. Steinmeier R, Bauhuf C, Hubner U, et al. Slow rhythmic oscillations of blood pressure, intracranial pressure, microcirculation, and cerebral oxygenation. Dynamic interrelation and time course in humans. *Stroke*. 1996;27(12):2236-2243.
- 307. Rosner MJ. Introduction to cerebral perfusion pressure management. *Neurosurgery Clinics of North America*. 1995;6(4):761-773.
- 308. Lang EW, Chesnut RM. A bedside method for investigating the integrity and critical thresholds of cerebral pressure autoregulation in severe traumatic brain injury patients. *British Journal of Neurosurgery*. 2000;14(2):117-126.
- 309. Czosnyka M, Richards H, Kirkpatrick P, Pickard J. Assessment of cerebral autoregulation with ultrasound and laser Doppler wave forms--an experimental study in anesthetized rabbits. *Neurosurgery*. 1994;35(2):287-292.
- 310. Lassen NA. Cerebral blood flow and oxygen consumption in man. *Physiological Reviews*. 1959;39(2):183-238.
- 311. Udomphorn Y, Armstead WM, Vavilala MS. Cerebral blood flow and autoregulation after pediatric traumatic brain injury. *Pediatric Neurology*. 2008;38(4):225-234.
- 312. Severinghaus JW, Lassen N. Step hypocapnia to separate arterial from tissue PCO₂ in the regulation of cerebral blood flow. *Circulation Research*. 1967;20(2):272-278.

-
- 313.** Lavi S, Egbarya R, Lavi R, Jacob G. Role of nitric oxide in the regulation of cerebral blood flow in humans: chemoregulation versus mechanoregulation. *Circulation*. 2003;107(14):1901-1905.
- 314.** Ebel H, Rust DS, Leschinger A, et al. Vasomotion, regional cerebral blood flow and intracranial pressure after induced subarachnoid haemorrhage in rats. *Zentralblatt fur Neurochirurgie*. 1996;57(3):150-155.
- 315.** Schmieder K, Moller F, Engelhardt M, et al. Dynamic cerebral autoregulation in patients with ruptured and unruptured aneurysms after induction of general anesthesia. *Zentralblatt fur Neurochirurgie*. 2006;67(2):81-87.
- 316.** Lam JM, Smielewski P, Czosnyka M, Pickard JD, Kirkpatrick PJ. Predicting delayed ischemic deficits after aneurysmal subarachnoid hemorrhage using a transient hyperemic response test of cerebral autoregulation. *Neurosurgery*. 2000;47(4):819-825.
- 317.** Lang EW, Diehl RR, Mehdorn HM. Cerebral autoregulation testing after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: the phase relationship between arterial blood pressure and cerebral blood flow velocity. *Critical Care Medicine*. 2001;29(1):158-163.
- 318.** Ratsep T, Asser T. Cerebral hemodynamic impairment after aneurysmal subarachnoid hemorrhage as evaluated using transcranial doppler ultrasonography: relationship to delayed cerebral ischemia and clinical outcome. *Journal of Neurosurgery*. 2001;95(3):393-401.
- 319.** Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(16):9220-9225.
- 320.** Stuehr D, Pou S, Rosen GM. Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(18):14533-14536.
- 321.** Zimmermann C, Haberl RL. L-arginine improves diminished cerebral CO₂ reactivity in patients. *Stroke*. 2003;34(3):643-647.
- 322.** Tseng MY, Czosnyka M, Richards H, Pickard JD, Kirkpatrick PJ. Effects of acute treatment with pravastatin on cerebral vasospasm, autoregulation, and delayed ischemic deficits after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a phase II randomized placebo-controlled trial. *Stroke*. 2005;36(8):1627-1632.
- 323.** Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988;332(6163):411-415.
- 324.** Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three

- separate genes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1989;86(8):2863-2867.
- 325.** Hocher B, Schwarz A, Fagan KA, et al. Pulmonary fibrosis and chronic lung inflammation in ET-1 transgenic mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000;23(1):19-26.
- 326.** Malek A, Izumo S. Physiological fluid shear stress causes downregulation of endothelin-1 mRNA in bovine aortic endothelium. *The American Journal of Physiology.* 1992;263(2 Pt 1):C389-396.
- 327.** Barton M, Shaw S, d'Uscio LV, Moreau P, Luscher TF. Angiotensin II increases vascular and renal endothelin-1 and functional endothelin converting enzyme activity in vivo: role of ETA receptors for endothelin regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1997;238(3):861-865.
- 328.** Ito H, Hirata Y, Adachi S, et al. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *The Journal of Clinical Investigation.* 1993;92(1):398-403.
- 329.** Matsuura A, Yamochi W, Hirata K, Kawashima S, Yokoyama M. Stimulatory interaction between vascular endothelial growth factor and endothelin-1 on each gene expression. *Hypertension.* 1998;32(1):89-95.
- 330.** Corder R, Carrier M, Khan N, Klemm P, Vane JR. Cytokine regulation of endothelin-1 release from bovine aortic endothelial cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology.* 1995;26 Suppl 3:S56-58.
- 331.** Schwarting A, Schlaak J, Lotz J, Pfers I, Meyer zum Buschenfelde KH, Mayet WJ. Endothelin-1 modulates the expression of adhesion molecules on fibroblast-like synovial cells (FLS). *Scand J Rheumatol.* 1996;25(4):246-256.
- 332.** Yanagisawa M, Inoue A, Takuwa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T. The human preproendothelin-1 gene: possible regulation by endothelial phosphoinositide turnover signaling. *Journal of Cardiovascular Pharmacology.* 1989;13 Suppl 5:S13-17.
- 333.** Yoshimoto S, Ishizaki Y, Sasaki T, Murota S. Effect of carbon dioxide and oxygen on endothelin production by cultured porcine cerebral endothelial cells. *Stroke.* 1991;22(3):378-383.
- 334.** Unoki H, Fan J, Watanabe T. Low-density lipoproteins modulate endothelial cells to secrete endothelin-1 in a polarized pattern: a study using a culture model system simulating arterial intima. *Cell and Tissue Research.* 1999;295(1):89-99.
- 335.** Lam HC, Takahashi K, Ghatei MA, Warrens AN, Rees AJ, Bloom SR. Immunoreactive endothelin in human plasma, urine, milk, and saliva. *Journal of Cardiovascular Pharmacology.* 1991;17 Suppl 7:S390-393.

- 336. Rubanyi GM, Polokoff MA. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacological Reviews*. 1994;46(3):325-415.
- 337. Rothoerl RD, Ringel F. Molecular mechanisms of cerebral vasospasm following aneurysmal SAH. *Neurological Research*. 2007;29(7):636-642.
- 338. Kohan DE, Rossi NF, Inscho EW, Pollock DM. Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin. *Physiological Reviews*. 2011;91(1):1-77.
- 339. Levin ER. Endothelins. *The New England Journal of Medicine*. 1995;333(6):356-363.
- 340. Seo B, Oemar BS, Siebenmann R, von Segesser L, Luscher TF. Both ETA and ETB receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels. *Circulation*. 1994;89(3):1203-1208.
- 341. Somlyo AV, Bond M, Somlyo AP, Scarpa A. Inositol trisphosphate-induced calcium release and contraction in vascular smooth muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985;82(15):5231-5235.
- 342. Simonson MS, Dunn MJ. Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *FASEB J*. 1990;4(12):2989-3000.
- 343. Thampatty BP, Sherwood PR, Gallek MJ, et al. Role of endothelin-1 in human aneurysmal subarachnoid hemorrhage: associations with vasospasm and delayed cerebral ischemia. *Neurocritical Care*. 2011;15(1):19-27.
- 344. Fassbender K, Hodapp B, Rossol S, et al. Endothelin-1 in subarachnoid hemorrhage: An acute-phase reactant produced by cerebrospinal fluid leukocytes. *Stroke*. 2000;31(12):2971-2975.
- 345. Suzuki K, Meguro K, Sakurai T, Saitoh Y, Takeuchi S, Nose T. Endothelin-1 concentration increases in the cerebrospinal fluid in cerebral vasospasm caused by subarachnoid hemorrhage. *Surgical Neurology*. 2000;53(2):131-135.
- 346. Kastner S, Oertel MF, Scharbrodt W, Krause M, Boker DK, Deinsberger W. Endothelin-1 in plasma, cisternal CSF and microdialysate following aneurysmal SAH. *Acta Neurochirurgica*. 2005;147(12):1271-1279.
- 347. Kessler IM, Pacheco YG, Lozzi SP, de Araujo AS, Jr., Onishi FJ, de Mello PA. Endothelin-1 levels in plasma and cerebrospinal fluid of patients with cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Surgical Neurology*. 2005;64 Suppl 1:S1:2-5.
- 348. Hansen-Schwartz J, Hoel NL, Zhou M, Xu CB, Svendgaard NA, Edvinsson L. Subarachnoid hemorrhage enhances endothelin receptor expression and

- function in rat cerebral arteries. *Neurosurgery*. 2003;52(5):1188-1194; 1194-1185.
- 349.** Vikman P, Beg S, Khurana TS, Hansen-Schwartz J, Edvinsson L. Gene expression and molecular changes in cerebral arteries following subarachnoid hemorrhage in the rat. *J Neurosurg*. 2006;105(3):438-444.
- 350.** Kasuya H, Weir BK, White DM, Stefansson K. Mechanism of oxyhemoglobin-induced release of endothelin-1 from cultured vascular endothelial cells and smooth-muscle cells. *Journal of Neurosurgery*. 1993;79(6):892-898.
- 351.** Peltonen S, Juvela S, Kaste M, Lassila R. Hemostasis and fibrinolysis activation after subarachnoid hemorrhage. *Journal of Neurosurgery*. 1997;87(2):207-214.
- 352.** Ramzy D, Rao V, Tumati LC, et al. Elevated endothelin-1 levels impair nitric oxide homeostasis through a PKC-dependent pathway. *Circulation*. 2006;114(1 Suppl):I319-326.
- 353.** Vajkoczy P, Meyer B, Weidauer S, et al. Clazosentan (AXV-034343), a selective endothelin A receptor antagonist, in the prevention of cerebral vasospasm following severe aneurysmal subarachnoid hemorrhage: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter phase IIa study. *Journal of Neurosurgery*. 2005;103(1):9-17.
- 354.** Macdonald RL, Kassell NF, Mayer S, et al. Clazosentan to overcome neurological ischemia and infarction occurring after subarachnoid hemorrhage (CONSCIOUS-1): randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 dose-finding trial. *Stroke*. 2008;39(11):3015-3021.
- 355.** Macdonald RL, Higashida RT, Keller E, et al. Randomized trial of clazosentan in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage undergoing endovascular coiling. *Stroke*. 2012;43(6):1463-1469.
- 356.** Kramer A, Fletcher J. Do endothelin-receptor antagonists prevent delayed neurological deficits and poor outcomes after aneurysmal subarachnoid hemorrhage?: a meta-analysis. *Stroke*. 2009;40(10):3403-3406.
- 357.** Nogueira RG, Bodock MJ, Koroshetz WJ, et al. High-dose bosentan in the prevention and treatment of subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm: an open-label feasibility study. *Neurocritical Care*. 2007;7(3):194-202.
- 358.** Shaw MD, Vermeulen M, Murray GD, Pickard JD, Bell BA, Teasdale GM. Efficacy and safety of the endothelin, receptor antagonist TAK-044 in treating subarachnoid hemorrhage: a report by the Steering Committee on behalf of the UK/Netherlands/Eire TAK-044 Subarachnoid Haemorrhage Study Group. *J Neurosurg*. 2000;93(6):992-997.

- 359.** Vergouwen MD. Effect of endothelin-receptor antagonists on delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage remains unclear. *Stroke*. 2009;40(12):e714; author reply e715-716.
- 360.** Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG, Group NCRRGW. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *British Journal of Pharmacology*. 2010;160(7):1577-1579.
- 361.** Guillen J. FELASA guidelines and recommendations. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*. 2012;51(3):311-321.
- 362.** Thal SC, Plesnila N. Non-invasive intraoperative monitoring of blood pressure and arterial pCO₂ during surgical anesthesia in mice. *Journal of Neuroscience Methods*. 2007;159(2):261-267.
- 363.** Kataoka H, Kim SW, Plesnila N. Leukocyte-endothelium interactions during permanent focal cerebral ischemia in mice. *Journal Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2004;24(6):668-676.
- 364.** Plesnila N, Putz C, Rinecker M, et al. Measurement of absolute values of hemoglobin oxygenation in the brain of small rodents by near infrared reflection spectrophotometry. *Journal of Neuroscience Methods*. 2002;114(2):107-117.
- 365.** Frerichs KU, Feuerstein GZ. Laser-Doppler flowmetry. A review of its application for measuring cerebral and spinal cord blood flow. *Molecular and chemical neuropathology / sponsored by the International Society for Neurochemistry and the World Federation of Neurology and Research Groups on Neurochemistry and Cerebrospinal Fluid*. 1990;12(1):55-70.
- 366.** Schmid-Elsaesser R, Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen HJ. A critical reevaluation of the intraluminal thread model of focal cerebral ischemia: evidence of inadvertent premature reperfusion and subarachnoid hemorrhage in rats by laser-Doppler flowmetry. *Stroke*. 1998;29(10):2162-2170.
- 367.** Strahler AN. Geomorphic Significance of Valleys and Parks of the Kaibab and Coconino Plateaus, Arizona. *Science*. 1944;100(2593):219-220.
- 368.** Jiang ZL, Kassab GS, Fung YC. Diameter-defined Strahler system and connectivity matrix of the pulmonary arterial tree. *Journal of Applied Physiology*. 1994;76(2):882-892.
- 369.** Lapi D, Marchiafava PL, Colantuoni A. Pial microvascular responses to transient bilateral common carotid artery occlusion: effects of hypertonic glycerol. *Journal of Vascular Research*. 2008;45(2):89-102.
- 370.** Nordsletten DA, Blackett S, Bentley MD, Ritman EL, Smith NP. Structural morphology of renal vasculature. *American journal of physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 2006;291(1):H296-309.

- 371.** Toroczkai Z. Topological classification of binary trees using the Horton-Strahler index. *Physical review. E, Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*. 2002;65(1 Pt 2):016130.
- 372.** Uylings HB, Smit GJ, Veltman WA. Ordering methods in quantitative analysis of branching structures of dendritic trees. *Advances in Neurology*. 1975;12:347-354.
- 373.** Roux S, Breu V, Giller T, et al. Ro 61-1790, a new hydrosoluble endothelin antagonist: general pharmacology and effects on experimental cerebral vasospasm. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1997;283(3):1110-1118.
- 374.** Breu V, Clozel M, Burri K, Hirth G, Neidhart W, Ramuz H. In vitro characterisation of Ro 46-8443, the first non-peptide antagonist selective for the endothelin ETB receptor. *FEBS Letters*. 1996;383(1-2):37-41.
- 375.** Bruderer S, Detishin V, Tsvitbaum N, Dingemanse J. Influence of different degrees of liver impairment on the pharmacokinetics of clazosentan. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2011;71(1):52-60.
- 376.** Clozel M, Breu V, Gray GA, et al. Pharmacological characterization of bosentan, a new potent orally active nonpeptide endothelin receptor antagonist. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1994;270(1):228-235.
- 377.** Sabri M, Ai J, Macdonald RL. Dissociation of vasospasm and secondary effects of experimental subarachnoid hemorrhage by clazosentan. *Stroke*. 2011;42(5):1454-1460.
- 378.** Chen G, Tariq A, Ai J, et al. Different effects of clazosentan on consequences of subarachnoid hemorrhage in rats. *Brain Research*. 2011;1392:132-139.
- 379.** Schubert GA, Schilling L, Thome C. Clazosentan, an endothelin receptor antagonist, prevents early hypoperfusion during the acute phase of massive experimental subarachnoid hemorrhage: a laser Doppler flowmetry study in rats. *Journal of Neurosurgery*. 2008;109(6):1134-1140.
- 380.** Vatter H, Konczalla J, Weidauer S, et al. Characterization of the endothelin-B receptor expression and vasomotor function during experimental cerebral vasospasm. *Neurosurgery*. 2007;60(6):1100-1108.
- 381.** Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, et al. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radical Biology & Medicine*. 2003;35(7):790-796.
- 382.** Godecke A, Decking UK, Ding Z, et al. Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. *Circulation Research*. 1998;82(2):186-194.

- 383.** Gregg AR, Schauer A, Shi O, Liu Z, Lee CG, O'Brien WE. Limb reduction defects in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *The American Journal of Physiology*. 1998;275(6 Pt 2):H2319-2324.
- 384.** Shesely EG, Maeda N, Kim HS, et al. Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(23):13176-13181.
- 385.** Huang PL, Huang Z, Mashimo H, et al. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*. 1995;377(6546):239-242.
- 386.** Wood KC, Cortese-Krott MM, Kovacic JC, et al. Circulating blood endothelial nitric oxide synthase contributes to the regulation of systemic blood pressure and nitrite homeostasis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2013;33(8):1861-1871.
- 387.** Schwarzmaier SM, Terpolilli NA, Dienel A, et al. Endothelial nitric oxide synthase mediates arteriolar vasodilatation after traumatic brain injury in mice. *Journal of Neurotrauma*. 2015;32(10):731-738.
- 388.** Nelson RJ. The use of genetic "knockout" mice in behavioral endocrinology research. *Hormones and Behavior*. 1997;31(3):188-196.
- 389.** Boer R, Ulrich WR, Klein T, Mirau B, Haas S, Baur I. The inhibitory potency and selectivity of arginine substrate site nitric-oxide synthase inhibitors is solely determined by their affinity toward the different isoenzymes. *Molecular Pharmacology*. 2000;58(5):1026-1034.
- 390.** Garvey EP, Oplinger JA, Furfine ES, et al. 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(8):4959-4963.
- 391.** Zhang HQ, Fast W, Marletta MA, Martasek P, Silverman RB. Potent and selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase by N omega-propyl-L-arginine. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1997;40(24):3869-3870.
- 392.** Babu BR, Griffith OW. N5-(1-Imino-3-butenyl)-L-ornithine. A neuronal isoform selective mechanism-based inactivator of nitric oxide synthase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(15):8882-8889.
- 393.** Pigott B, Bartus K, Garthwaite J. On the selectivity of neuronal NOS inhibitors. *British Journal of Pharmacology*. 2013;168(5):1255-1265.
- 394.** Ellis EF, Wei EP, Cockrell CS, Choi S, Kontos HA. The effect of PGF2 alpha on in vivo cerebral arteriolar diameter in cats and rats. *Prostaglandins*. 1983;26(6):917-923.

- 395.** Deng J, Lei C, Chen Y, et al. Neuroprotective gases--fantasy or reality for clinical use? *Progress in Neurobiology*. 2014;115:210-245.
- 396.** Gargiulo S, Greco A, Gramanzini M, et al. Mice anesthesia, analgesia, and care, Part I: anesthetic considerations in preclinical research. *ILAR Journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*. 2012;53(1):E55-69.
- 397.** Hoffman WE, Thomas C, Albrecht RF. The effect of halothane and isoflurane on neurologic outcome following incomplete cerebral ischemia in the rat. *Anesthesia and Analgesia*. 1993;76(2):279-283.
- 398.** Inoue S, Kawaguchi M, Kurehara K, et al. Mild hypothermia can enhance pial arteriolar vasodilation induced by isoflurane and sevoflurane in cats. *Critical Care Medicine*. 2002;30(8):1863-1869.
- 399.** Li CX, Patel S, Auerbach EJ, Zhang X. Dose-dependent effect of isoflurane on regional cerebral blood flow in anesthetized macaque monkeys. *Neuroscience Letters*. 2013;541:58-62.
- 400.** Burchell SR, Dixon BJ, Tang J, Zhang JH. Isoflurane provides neuroprotection in neonatal hypoxic ischemic brain injury. *Journal of Investigative Medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research*. 2013;61(7):1078-1083.
- 401.** Zhao P, Zuo Z. Isoflurane preconditioning induces neuroprotection that is inducible nitric oxide synthase-dependent in neonatal rats. *Anesthesiology*. 2004;101(3):695-703.
- 402.** Xiong L, Zheng Y, Wu M, et al. Preconditioning with isoflurane produces dose-dependent neuroprotection via activation of adenosine triphosphate-regulated potassium channels after focal cerebral ischemia in rats. *Anesthesia and Analgesia*. 2003;96(1):233-237.
- 403.** Matchett GA, Allard MW, Martin RD, Zhang JH. Neuroprotective effect of volatile anesthetic agents: molecular mechanisms. *Neurological Research*. 2009;31(2):128-134.
- 404.** Zhang HP, Yuan LB, Zhao RN, et al. Isoflurane preconditioning induces neuroprotection by attenuating ubiquitin-conjugated protein aggregation in a mouse model of transient global cerebral ischemia. *Anesthesia and Analgesia*. 2010;111(2):506-514.
- 405.** Altay O, Suzuki H, Hasegawa Y, et al. Isoflurane attenuates blood-brain barrier disruption in ipsilateral hemisphere after subarachnoid hemorrhage in mice. *Stroke*. 2012;43(9):2513-2516.

-
406. Khatibi NH, Ma Q, Rolland W, et al. Isoflurane posttreatment reduces brain injury after an intracerebral hemorrhagic stroke in mice. *Anesthesia and Analgesia*. 2011;113(2):343-348.
407. Li H, Yin J, Li L, Deng J, Feng C, Zuo Z. Isoflurane postconditioning reduces ischemia-induced nuclear factor-kappaB activation and interleukin 1beta production to provide neuroprotection in rats and mice. *Neurobiology of Disease*. 2013;54:216-224.
408. Altay O, Suzuki H, Hasegawa Y, Ostrowski RP, Tang J, Zhang JH. Isoflurane on brain inflammation. *Neurobiology of Disease*. 2014;62:365-371.
409. Ozden S, Isenmann S. Neuroprotective properties of different anesthetics on axotomized rat retinal ganglion cells in vivo. *Journal of Neurotrauma*. 2004;21(1):73-82.
410. Jolkkonen J, Puurunen K, Koistinaho J, et al. Neuroprotection by the alpha2-adrenoceptor agonist, dexmedetomidine, in rat focal cerebral ischemia. *European Journal of Pharmacology*. 1999;372(1):31-36.
411. Maier C, Steinberg GK, Sun GH, Zhi GT, Maze M. Neuroprotection by the alpha 2-adrenoreceptor agonist dexmedetomidine in a focal model of cerebral ischemia. *Anesthesiology*. 1993;79(2):306-312.
412. Ito H, Watanabe Y, Isshiki A, Uchino H. Neuroprotective properties of propofol and midazolam, but not pentobarbital, on neuronal damage induced by forebrain ischemia, based on the GABAA receptors. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*. 1999;43(2):153-162.
413. Dalkara T, Irikura K, Huang Z, Panahian N, Moskowitz MA. Cerebrovascular responses under controlled and monitored physiological conditions in the anesthetized mouse. *Journal Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 1995;15(4):631-638.
414. Scheid P, Lofaso F, Isabey D, Harf A. Respiratory response to inhaled CO2 during positive inspiratory pressure in humans. *Journal of Applied Physiology*. 1994;77(2):876-882.
415. Larsen R. [Multiple organ failure--light at the end of the tunnel?]. *Der Anaesthesist*. 2001;50(11):817-818.
416. Rajan V, Varghese B, van Leeuwen TG, Steenbergen W. Review of methodological developments in laser Doppler flowmetry. *Lasers in Medical Science*. 2009;24(2):269-283.
417. Eyre JA, Essex TJ, Flecknell PA, Bartholomew PH, Sinclair JI. A comparison of measurements of cerebral blood flow in the rabbit using laser Doppler spectroscopy and radionuclide labelled microspheres. *Clinical physics and physiological measurement : an official journal of the Hospital Physicists'*

- Association, Deutsche Gesellschaft für Medizinische Physik and the European Federation of Organisations for Medical Physics. 1988;9(1):65-74.
- 418.** Kocher M. Metabolic and hemodynamic activation of postischemic rat brain by cortical spreading depression. *Journal Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 1990;10(4):564-571.
- 419.** Carter LP. Surface monitoring of cerebral cortical blood flow. *Cerebrovascular and Brain Metabolism Reviews*. 1991;3(3):246-261.
- 420.** Piper RD, Lambert GA, Duckworth JW. Cortical blood flow changes during spreading depression in cats. *The American Journal of Physiology*. 1991;261(1 Pt 2):H96-102.
- 421.** Morita-Tsuzuki Y, Bouskela E, Hardebo JE. Vasomotion in the rat cerebral microcirculation recorded by laser-Doppler flowmetry. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1992;146(4):431-439.
- 422.** Flohr H, Hoppe A. Autoradiographic technique to assess distribution of blood flow within organs. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*. 1969;310(1):16-21.
- 423.** Lin CL, Calisaneller T, Ukita N, Dumont AS, Kassell NF, Lee KS. A murine model of subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm. *Journal of Neuroscience Methods*. 2003;123(1):89-97.
- 424.** Solomon RA, Antunes JL, Chen RY, Bland L, Chien S. Decrease in cerebral blood flow in rats after experimental subarachnoid hemorrhage: a new animal model. *Stroke*. 1985;16(1):58-64.
- 425.** Delgado TJ, Brismar J, Svendgaard NA. Subarachnoid haemorrhage in the rat: angiography and fluorescence microscopy of the major cerebral arteries. *Stroke*. 1985;16(4):595-602.
- 426.** Altay T, Smithson S, Volokh N, Rasmussen PA, Ransohoff RM, Provencio JJ. A novel method for subarachnoid hemorrhage to induce vasospasm in mice. *Journal of Neuroscience Methods*. 2009;183(2):136-140.
- 427.** Buhler D, Schuller K, Plesnila N. Protocol for the induction of subarachnoid hemorrhage in mice by perforation of the Circle of Willis with an endovascular filament. *Translational Stroke Research*. 2014;5(6):653-659.
- 428.** Titova E, Ostrowski RP, Zhang JH, Tang J. Experimental models of subarachnoid hemorrhage for studies of cerebral vasospasm. *Neurological Research*. 2009;31(6):568-581.
- 429.** Gao J, Wang H, Sheng H, et al. A novel apoE-derived therapeutic reduces vasospasm and improves outcome in a murine model of subarachnoid hemorrhage. *Neurocritical Care*. 2006;4(1):25-31.

- 430. Kamii H, Kato I, Kinouchi H, et al. Amelioration of vasospasm after subarachnoid hemorrhage in transgenic mice overexpressing CuZn-superoxide dismutase. *Stroke*. 1999;30(4):867-871.
- 431. McGirt MJ, Parra A, Sheng H, et al. Attenuation of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in mice overexpressing extracellular superoxide dismutase. *Stroke*. 2002;33(9):2317-2323.
- 432. McGirt MJ, Lynch JR, Parra A, et al. Simvastatin increases endothelial nitric oxide synthase and ameliorates cerebral vasospasm resulting from subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2002;33(12):2950-2956.
- 433. Parra A, McGirt MJ, Sheng H, Laskowitz DT, Pearlstein RD, Warner DS. Mouse model of subarachnoid hemorrhage associated cerebral vasospasm: methodological analysis. *Neurological Research*. 2002;24(5):510-516.
- 434. Saito A, Kamii H, Kato I, et al. Transgenic CuZn-superoxide dismutase inhibits NO synthase induction in experimental subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2001;32(7):1652-1657.
- 435. Sehba FA, Friedrich V. Early micro vascular changes after subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochirurgica. Supplement*. 2011;110(Pt 1):49-55.
- 436. Liu S, Tang J, Ostrowski RP, et al. Oxidative stress after subarachnoid hemorrhage in gp91phox knockout mice. *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien des Sciences Neurologiques*. 2007;34(3):356-361.
- 437. Sozen T, Tsuchiyama R, Hasegawa Y, et al. Role of interleukin-1beta in early brain injury after subarachnoid hemorrhage in mice. *Stroke*. 2009;40(7):2519-2525.
- 438. Okubo S, Strahle J, Keep RF, Hua Y, Xi G. Subarachnoid hemorrhage-induced hydrocephalus in rats. *Stroke*. 2013;44(2):547-550.
- 439. Lackner P, Vahmjanin A, Hu Q, Krafft PR, Rolland W, Zhang JH. Chronic hydrocephalus after experimental subarachnoid hemorrhage. *PloS One*. 2013;8(7):e69571.
- 440. Rovainen CM, Woolsey TA, Blocher NC, Wang DB, Robinson OF. Blood flow in single surface arterioles and venules on the mouse somatosensory cortex measured with videomicroscopy, fluorescent dextrans, nonoccluding fluorescent beads, and computer-assisted image analysis. *Journal Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 1993;13(3):359-371.
- 441. Hillen F, Kaijzel EL, Castermans K, oude Egbrink MG, Lowik CW, Griffioen AW. A transgenic Tie2-GFP athymic mouse model; a tool for vascular biology in

- xenograft tumors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008;368(2):364-367.
442. Dunphy MP, Entenberg D, Toledo-Crow R, Larson SM. In vivo microcartography and subcellular imaging of tumor angiogenesis: a novel platform for translational angiogenesis research. *Microvascular Research*. 2009;78(1):51-56.
 443. Broderick JP, Brott TG, Duldner JE, Tomsick T, Leach A. Initial and recurrent bleeding are the major causes of death following subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 1994;25(7):1342-1347.
 444. Cross DT, 3rd, Tirschwell DL, Clark MA, et al. Mortality rates after subarachnoid hemorrhage: variations according to hospital case volume in 18 states. *Journal of Neurosurgery*. 2003;99(5):810-817.
 445. Nornes H, Magnaes B. Recurrent haemorrhage and haemostasis in patients with ruptured intracranial saccular aneurysms. *Acta Neurologica Scandinavica. Supplementum*. 1972;51:473-476.
 446. Kataoka K, Taneda M. Reversible arterial hypotension after acute aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Surgical Neurology*. 1985;23(2):157-161.
 447. Magder SA. The highs and lows of blood pressure: toward meaningful clinical targets in patients with shock. *Critical Care Medicine*. 2014;42(5):1241-1251.
 448. Yang MF, Sun BL, Xia ZL, Zhu LZ, Qiu PM, Zhang SM. Alleviation of brain edema by L-arginine following experimental subarachnoid hemorrhage in a rat model. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 2003;29(3-4):437-443.
 449. Sun BL, Zhang SM, Xia ZL, et al. L-arginine improves cerebral blood perfusion and vasomotion of microvessels following subarachnoid hemorrhage in rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 2003;29(3-4):391-400.
 450. Mehta S, Stewart DJ, Levy RD. The hypotensive effect of L-arginine is associated with increased expired nitric oxide in humans. *Chest*. 1996;109(6):1550-1555.
 451. Bath PM, Willmot M, Leonardi-Bee J, Bath FJ. Nitric oxide donors (nitrates), L-arginine, or nitric oxide synthase inhibitors for acute stroke. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2002(4):CD000398.
 452. Albert J, Norman M, Wallen NH, Frostell C, Hjemdahl P. Inhaled nitric oxide does not influence bleeding time or platelet function in healthy volunteers. *European Journal of Clinical Investigation*. 1999;29(11):953-959.
 453. Krejcy K, Schmetterer L, Kastner J, et al. Role of nitric oxide in hemostatic system activation in vivo in humans. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1995;15(11):2063-2067.

- 454. Samama CM, Diaby M, Fellahi JL, et al. Inhibition of platelet aggregation by inhaled nitric oxide in patients with acute respiratory distress syndrome. *Anesthesiology*. 1995;83(1):56-65.
- 455. Terpolilli NA, Kim SW, Thal SC, Kuebler WM, Plesnila N. Inhaled nitric oxide reduces secondary brain damage after traumatic brain injury in mice. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2013;33(2):311-318.
- 456. Inglessis I, Shin JT, Lepore JJ, et al. Hemodynamic effects of inhaled nitric oxide in right ventricular myocardial infarction and cardiogenic shock. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;44(4):793-798.
- 457. Frostell CG, Blomqvist H, Hedenstierna G, Lundberg J, Zapol WM. Inhaled nitric oxide selectively reverses human hypoxic pulmonary vasoconstriction without causing systemic vasodilation. *Anesthesiology*. 1993;78(3):427-435.
- 458. Day RW, Lynch JM, White KS, Ward RM. Acute response to inhaled nitric oxide in newborns with respiratory failure and pulmonary hypertension. *Pediatrics*. 1996;98(4 Pt 1):698-705.
- 459. Hogman M, Frostell C, Arnberg H, Sandhagen B, Hedenstierna G. Prolonged bleeding time during nitric oxide inhalation in the rabbit. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1994;151(1):125-129.
- 460. Hansen-Schwartz J. Cerebral vasospasm: a consideration of the various cellular mechanisms involved in the pathophysiology. *Neurocritical Care*. 2004;1(2):235-246.
- 461. Janjua N, Mayer SA. Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Current Opinion in Critical Care*. 2003;9(2):113-119.
- 462. Stein SC, Levine JM, Nagpal S, LeRoux PD. Vasospasm as the sole cause of cerebral ischemia: how strong is the evidence? *Neurosurgical Focus*. 2006;21(3):E2.
- 463. Sun BL, Zheng CB, Yang MF, Yuan H, Zhang SM, Wang LX. Dynamic alterations of cerebral pial microcirculation during experimental subarachnoid hemorrhage. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2009;29(2):235-241.
- 464. Durmaz R, Ozkara E, Kanbak G, et al. Nitric oxide level and adenosine deaminase activity in cerebrospinal fluid of patients with subarachnoid hemorrhage. *Turkish Neurosurgery*. 2008;18(2):157-164.
- 465. Khaldi A, Zauner A, Reinert M, Woodward JJ, Bullock MR. Measurement of nitric oxide and brain tissue oxygen tension in patients after severe subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 2001;49(1):33-38.

- 466.** Ng WH, Mochhala S, Yeo TT, Ong PL, Ng PY. Nitric oxide and subarachnoid hemorrhage: elevated level in cerebrospinal fluid and their implications. *Neurosurgery*. 2001;49(3):622-626.
- 467.** Woszczyk A, Deinsberger W, Boker DK. Nitric oxide metabolites in cisternal CSF correlate with cerebral vasospasm in patients with a subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochirurgica*. 2003;145(4):257-263.
- 468.** Jung CS, Oldfield EH, Harvey-White J, et al. Association of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase with cerebral vasospasm in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Journal of Neurosurgery*. 2007;107(5):945-950.
- 469.** Medele RJ, Stummer W, Reulen HJ, Steiger HJ. Evidence for peroxidative damage by nitric oxide in experimental chronic cerebral vasospasm. *Neurological Research*. 1996;18(3):277-280.
- 470.** Sayama T, Suzuki S, Fukui M. Role of inducible nitric oxide synthase in the cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in rats. *Neurological Research*. 1999;21(3):293-298.
- 471.** Yamamoto S, Nishizawa S, Yokoyama T, Ryu H, Uemura K. Subarachnoid hemorrhage impairs cerebral blood flow response to nitric oxide but not to cyclic GMP in large cerebral arteries. *Brain Research*. 1997;757(1):1-9.
- 472.** Kasuya H, Weir BK, Nakane M, et al. Nitric oxide synthase and guanylate cyclase levels in canine basilar artery after subarachnoid hemorrhage. *Journal of Neurosurgery*. 1995;82(2):250-255.
- 473.** Sobey CG, Quan L. Impaired cerebral vasodilator responses to NO and PDE V inhibition after subarachnoid hemorrhage. *The American Journal of Physiology*. 1999;277(5 Pt 2):H1718-1724.
- 474.** van Giersbergen PL, Dingemanse J. Tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of clazosentan, a parenteral endothelin receptor antagonist. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2007;63(2):151-158.
- 475.** van Giersbergen PL, Gunawardena KA, Dingemanse J. Influence of ethnic origin and sex on the pharmacokinetics of clazosentan. *Journal of Clinical Pharmacology*. 2007;47(11):1374-1380.
- 476.** Moncada S, Higgs EA. Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol*. 2006(176 Pt 1):213-254.
- 477.** Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*. 2007;115(10):1285-1295.

- 478.** Lavi S, Gaitini D, Milloul V, Jacob G. Impaired cerebral CO₂ vasoreactivity: association with endothelial dysfunction. *American journal of physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 2006;291(4):H1856-1861.
- 479.** Fathi AR, Yang C, Bakhtian KD, Qi M, Lonser RR, Pluta RM. Carbon dioxide influence on nitric oxide production in endothelial cells and astrocytes: cellular mechanisms. *Brain Research*. 2011;1386:50-57.
- 480.** Friedrich B, Michalik R, Oniszczyk A, Abubaker K, Kozniowska E, Plesnila N. CO₂ has no therapeutic effect on early microvasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage. *Journal Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2014;34(8):e1-6.
- 481.** Sabri M, Ai J, Knight B, et al. Uncoupling of endothelial nitric oxide synthase after experimental subarachnoid hemorrhage. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2011;31(1):190-199.
- 482.** Luo S, Lei H, Qin H, Xia Y. Molecular mechanisms of endothelial NO synthase uncoupling. *Curr Pharm Des*. 2014;20(22):3548-3553.
- 483.** Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012;33(7):829-837.
- 484.** Capettini LS, Cortes SF, Gomes MA, et al. Neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide is a major endothelium-dependent relaxing factor. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 2008;295(6):H2503-2511.
- 485.** Stefanovic B, Schwindt W, Hoehn M, Silva AC. Functional uncoupling of hemodynamic from neuronal response by inhibition of neuronal nitric oxide synthase. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2007;27(4):741-754.

A. Danksagung

Für die Aufnahme in das Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin möchte ich mich bei Prof. Dr. med. U. Pohl herzlich bedanken.

Mein außerordentlicher Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila für das Dissertationsthema und die sehr gute Betreuung. Mit seiner fachlichen Kompetenz und seiner persönlichen Zuverlässigkeit hat er mich stets unterstützt und motiviert.

Von Herzen danke ich auch meiner Mitbetreuerin, Frau Dr. med. Nicole Terpolilli, die mich in meiner Dissertation von Anfang an begleitet hat, mir jederzeit geduldig zur Seite stand und mich durch ihre Leidenschaft am Forschen und Heilen immer wieder motiviert hat. Von Ihr habe ich viel gelernt.

Ganz herzlich bedanke ich mich auch bei meinem Mitbetreuer PD. Dr. med. Karsten Schöller, der mich als Doktorand engagiert hat. Er hat mich in seiner Zeit in München stets unterstützt und aktiv begleitet.

Für die tatkräftige und freundschaftliche Unterstützung bei der Durchführung der chirurgischen Experimente und Beschaffung der erforderlichen Materialien danke ich in besonderer Weise Nicole Heumos.

Dr. biol. hum. Jürgen Peters danke ich herzlich für seine Hilfestellung und Offenheit in Fragen zur Statistik und Computertechnik. Gerne erinnere ich mich an unsere weltanschaulichen und philosophischen Gespräche.

Zum Schluss denke ich auch dankbar an meinen Eltern und meine Geschwister die mich immer motivierten.

Laudate Dominum

B. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Ari Christian da Fonseca Dienel

Geburtsdatum: 04.07.1979

Geburtsort: Portimão/ Portugal

Nationalität: Deutsch/Portugiesisch

Aktuelle Beschäftigung

01.2011 – 04.2015 Doktorand am Walter-Brendel-Zentrum (AG Plesnila), Institut für Chirurgische Forschung, Ludwig-Maximilians-Universität zu München: Thema der Dissertation “Veränderung der Mikrozirkulation nach experimenteller Subarachnoidalblutung (SAB): Kinetik, Bedeutung und Identifikation von Mechanismen”.

Wissenschaftliche Projekte

10.2010 – 11.2010 Molekularbiologische Projektarbeit am Paul-Flechsig-Institut, in Leipzig. Thema: „Untersuchung von Zellzyklus Inhibitoren, P16 (Tumorsupressor Protein/Gen), im Alzheimer-Hirn“

08.2010 – 10.2010 Projektarbeit am Paul-Flechsig-Institut, Hirnforschungszentrum, in Leipzig. Thema „Analyse des Vorhandenseins und der potentiellen Sekretion von Matrix-relevanten Molekülen in verschiedenen Zelllinien (MDCK, N2A, COS, SY5Y, GT1-7)“

- 03.2008 – 09.2008 Diplomarbeit am Paul-Flechsig-Institut in Leipzig (Alzheimer-Forschungszentrum) Thema: "Einfluss der Pseudophosphorylierung auf die Tau-Phosphorylierungsmuster, Zytoskelettstabilität und Zellvitalität in N2a Neuroblastomazellen"
- 02.2006 – 04.2006 Projektarbeit am Paul-Flechsig-Institut, in Leipzig (Alzheimer-Forschungszentrum). Thema: „Einfluss der Dimerisierung auf die Phosphorylierung von Tau-Proteinen in murinen Neuroblastomazellkulturen (N2a)“.
- 07.2004 – 10.2004 Projektarbeit am Biotechnologie-Zentrum in Leipzig. Thema: "Kultivierung und Charakterisierung von embryonalen Kardiomyozyten aus dem Huhn, für Anwendung auf Micro-Elektrode-Arrays (MEAs)"

Bildung

- 10.2000 – 09.2008 Diplom in Biochemie an der Universität Leipzig
- 10.1999 – 03.2000 Sprachkurs "Deutsch als Fremdsprache (DAF)" an der Universität Trier.
- 09.1995 – 07.1998 Sekundarschule in Silves / Portugal; Abschluss: Abitur

Wehrdienst/Bundeswehr

11.1998 – 09.1999 Wehrdienst als Sanitätssoldat in Rennerod und Idar-Oberstein
(Dienstgrad: OG)

Andere Aktivitäten

06.08.2013 Simultanübersetzung aus dem Brasilianischen ins Deutsche für
einen Dokumentarfilm „Der verlorene Vater“ im Bayerischer
Rundfunk

05.2010 – 06.2010 Verkauf von Gesundheits- und ökologische Gartenanbau Lite-
ratur als selbstständiger Verkäufer in Schweden.

05.2000 – 09.2000

02.2001 – 03.2001 Elektrikerhelfer in der Firma Elektro-Schmitz, in Trier

11.2008 – 04.2010

07.2001-09.2001 Sitzfertigung bei Mercedes-Benz für die E-Klasse,

07.2002-09.2002 in Sindelfingen

Eidestattliche Versicherung

Ich, Ari Christian da Fonseca Dienel, erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Veränderung der Mikrozirkulation nach experimenteller Subarachnoidalblutung (SAB): Kinetik, Bedeutung und Identifikation von Mechanismen“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 13.09.2016